

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA**

Ciclo 32 °

Settore Concorsuale: 06/D3

Settore Scientifico Disciplinare: MED/06

**IDENTIFICAZIONI DI NUOVE ALTERAZIONI GENETICHE
NELL'ADENOCARCINOMA DUTTALE PANCREATICO E NELLE
LESIONI PRE CANCEROSE MEDIANTE TECNOLOGIA WHOLE
GENOME SEQUENCING E ONCOSCAN ARRAY**

Presentata da: Dott.ssa Sandra Durante

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Prof. Pierluigi Lollini

Dott.ssa Mariacristina Di Marco

Esame finale anno 2020

Ai miei figli

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. BIOLOGIA MOLECOLARE E STORIA NATURALE DEL CANCRO DEL PANCREAS	
1.1 Epidemiologia	4
1.2 Genetica e biologia molecolare	6
1.3 Anatomia patologica	9
1.4 Biologia molecolare IPMN	18
2. GESTIONE TERAPEUTICA DELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO	
2.1Trattamento chirurgico	20
2.2Trattamento radioterapico	22
2.3Trattamento chemioterapico	23
2.4Target therapies	30
3. APPROCCI MOLECOLARI IN ONCOLOGIA CLINICA	35
3.1 Tecnologia Microarray e applicazioni in oncologia medica	36
3.2 Tecniche di Sequenziamento Massivo in oncologia medica	40
4. STUDIO SPERIMENTALE DI CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DELL'ADENOCARCINOMA DUTTALE PANCREATICO MEDIANTE SEQUENZIAMENTO ED ONCOSCAN ARRAY	
4.1 Scopo dello studio	45
4.2 Pazienti e metodi	45

5. RISULTATI	57
6. DISCUSSIONE	70
7. BIBLIOGRAFIA	75

INTRODUZIONE

L'Adenocarcinoma pancreatico (PDAC) è uno dei tumori più letali con un tasso di sopravvivenza a cinque anni di circa il 5%. Un certo miglioramento nell'outcome di questa neoplasia si è ottenuto con lo sviluppo delle terapie target e con l'introduzione di innovativi schemi chemioterapici, quali il FOLFIRINOX e l'associazione gemcitabina più Nab-Paclitaxel, ma la percentuale delle persone che ne beneficia è bassissima. Attualmente il cancro del pancreas non è ascrivibile al gruppo dei tumori meglio caratterizzati sotto il profilo biologico e, a dispetto delle numerose informazioni fornite dagli studi di caratterizzazione genetica della neoplasia condotti negli ultimi anni, non è ancora ad oggi ipotizzabile un risvolto clinico di tali conoscenze.

Sulla base di queste premesse lo scopo di questo progetto sarà quello di analizzare il quadro complessivo delle alterazioni genetiche che caratterizzano l'eterogenità dell'adenocarcinoma pancreatico tramite sequenziamento massivo dell'esoma (WES) e analisi mediante tecnologia l'Oncoscan FFPE Assay, di campioni bioptici, tessuto fresco, e paraffinato provenienti da tumori pancreatici a diversi stadi di malattia (resecabili, localmente avanzati e metastatici).

Quindi si verificherà o meno la correlazione di profili mutazionali con il diverso andamento clinico dei pazienti sottoposti al trattamento medico, chemioterapico o radio-chemioterapico integrato, si identificheranno i profili genomici potenzialmente predittivi di risposta alla terapia e si cercherà di individuare eventuali signature genetiche correlabili con la prognosi e la sopravvivenza globale del paziente. In particolare questo progetto verrà condotto su circa 20 campioni in paraffina con metodologia Oncoscan Affymetrix FFPE per l'identificazione di copy number variation e su 30 campioni di tessuto fresco o bioptico con tecnologia WES per la ricerca di mutazioni puntiformi. Questo approccio integrato potrebbe permettere di avere un quadro biologico completo di tutte le alterazioni genetiche della malattia dalla lesione precancerosa al carcinoma metastatico per poter permettere di capire quale o quali sono gli eventi neoplastici che lo generano e poter quindi permettere uno studio farmacologico più mirato e più efficace.

1. BIOLOGIA MOLECOLARE E STORIA NATURALE DEL CANCRO DEL PANCREAS

1.1 EPIDEMIOLOGIA

L'adenocarcinoma pancreatico duttale si configura come la quarta causa di morte per cancro negli Stati Uniti, nonostante rappresenti solo il 3% di tutte le patologie oncologiche. Nel 2013 l'incidenza di tale morbidità negli USA è stata di 45200 nuovi casi, con un numero di decessi pari a 38460 casi. I dati statistici riguardanti l'incidenza e il tasso di mortalità tra maschi e femmine sono pressochè sovrapponibili, con una lieve prevalenza di incidenza e mortalità nel sesso maschile. Tale gap è, comunque, in decremento probabilmente in virtù dell'aumento dell'uso delle sigarette nel sesso femminile.

È inoltre rilevabile un tasso variabile di incidenza della patologia su base etnico-razziale, con la popolazione Afro-Americana che presenta una percentuale di incidenza e mortalità superiore rispetto alla popolazione caucasica e ad altri gruppi etnici. Tali disparità razziali riflettono una diversa esposizione a fattori di rischio (come il fumo) e una minore possibilità di accesso a diagnosi precoce e ad adeguati ed efficaci trattamenti. (1)

Il PDAC a dispetto della sua non elevata incidenza, e anche nei casi di diagnosi tempestiva, un tumore a prognosi infausta con una sopravvivenza a cinque anni stimata intorno al 5%. Gli stessi pazienti che sono avviati all'intervento chirurgico radicale, l'unico trattamento curativo e in grado di aumentare la sopravvivenza, presentano una mediana di sopravvivenza stimata intorno ai 20-22 mesi. (2)

1.1.1 Fattori di rischio

L'adenocarcinoma pancreatico è una patologia oncologica letale e sebbene la prevenzione primaria sia uno strumento di fondamentale importanza per la gestione della malattia, solo un piccolo numero di fattori di rischio è stato chiaramente identificato.

Possono riconoscersi come coinvolti nella patogenesi del tumore sia fattori ambientali che fattori genetici. (3)

Cancerogeni ambientali e condizioni patologiche predisponenti:

- *Fumo;*
- *Dieta;*
- *Caffè;*
- *Alcool;*
- *Fattori occupazionali;*
- *Malattie pre-esistenti.*

Sindromi ereditarie associate ad un aumento di rischio di adenocarcinoma duttale pancreatico

Circa il 5-10% dei pazienti affetti da cancro pancreatico hanno una storia familiare di malattia. Il tumore si sviluppa nell'ambito di ben definite sindromi ereditarie, per le quali sono note le alterazioni genetiche di base (4).

Le principali sindromi ereditarie con aumentato rischio di adenocarcinoma duttale pancreatico che si riscontrano sono:

- ***Sindrome di Peutz-Jeghers (PJS)*** - malattia autosomica dominante associata a mutazione germinale del gene oncosoppressore *STK11/LKB1* (19p 13.3) che codifica per una serina-treonina-chinasi;
- ***Pancreatite ereditaria;***
- ***Sindrome familiare dei nevi-melanomi atipici multipli (FAMM);***
- ***Sindrome del cancro ereditario della mammella e dell'ovaio*** - patologia associata a mutazioni germinali di due geni oncosoppressori BRCA1, sul cromosoma 17 e BRCA2 sul cromosoma 13;
- ***Sindrome di Lynch (HNPCC)*** - mutazioni sono a carico dei geni del DNA mismatch repair *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* e *PMS2*.
- ***PALB2/FANCN*** - carcinoma familiare del pancreas dovuto a mutazioni del gene *PALB2* che codifica per la proteina PALB2, coinvolta nel sistema di riparazione del DNA e che funge da partner e localizzatore di BRCA2. Varianti del gene *PALB2* sono associate ad un incrementato rischio di tumore della mammella, mentre mutazione biallelica di *PALB2* è coinvolta nell'anemia di Fanconi.

1.1.2 Screening e prevenzione

Il cancro pancreatico è una patologia difficile da diagnosticare ad uno stadio precoce, difficile da trattare e caratterizzata da scarsa sopravvivenza. Alla luce di queste considerazioni si comprende la necessità di mettere a punto strategie per la prevenzione primaria e lo screening del tumore. Sarebbe necessario intervenire sui fattori di rischio modificabili, quali lo stile di vita ed in particolare il fumo di sigaretta che è il più importante fattore di rischio ambientale della neoplasia pancreaticata. Utile risulta l'adozione di una dieta con ridotto apporto calorico, povera di grassi e ricca di frutta e verdura e l'implemento dell'attività fisica, anche in funzione della riduzione del rischio di obesità (5).

Le metodiche di screening dovrebbero basarsi su accertamenti il meno invasivi possibile e soprattutto sensibili e specifici, per la diagnosi di lesioni precursori e di cancri pancreatici a stadi iniziali, anche se lesioni pre-maligne e piccoli tumori sono solitamente asintomatici.

Sono stati analizzati diversi biomarkers tumorali, ma lo stesso CA19.9 si è dimostrato poco specifico e non a sufficienza sensibile per l'identificazione precoce del cancro. Tra le metodiche di imaging spicca il ruolo dell'ecoendoscopia.

Ancora oggi non sono comunque disponibili programmi di screening di massa che permettano una prevenzione secondaria del tumore, in particolare nei soggetti ad alto rischio. (6)

In Italia l'AISP attraverso il Registro Italiano del Cancro Familiare del Pancreas creato nel 2007, è impegnato nella stesura di un protocollo di studio per la diagnosi precoce e la prevenzione dei soggetti a rischio. Secondo i criteri internazionali (7), rivisitati nelle linee guida italiane (8), i soggetti che potenzialmente potrebbero essere sottoposti a programmi di sorveglianza sono:

- soggetti aventi tre o più consanguinei, a prescindere dal grado di parentela, sulla stessa linea, affetti da cancro del pancreas;
- due consanguinei, (direttamente correlati), sulla stessa linea, di cui almeno uno di primo grado, affetti da cancro del pancreas;
- portatori di mutazioni BRCA-1, BRCA-2 o p16 con almeno un consanguineo di primo o secondo grado, affetto da cancro del pancreas;
- un portatore di mutazione della Sindrome di Peutz-Jeghers;
- soggetto con pancreatite ereditaria;
- un soggetto con rischio stimato tramite software PancPro superiore a 10 volte il valore della popolazione generale.

1.2 GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

Nell'adenocarcinoma pancreatico i più comuni e precoci eventi che consentono alle cellule di acquisire instabilità genetica sono la disfunzione e il critico accorciamento dei telomeri che determinano compromissione dell'integrità cromosomica. Tale fenomeno è rintracciabile sia nelle lesioni precancerose che nei carcinomi invasivi. (9,10)

Il cancro pancreatico è dunque una malattia causata dall'accumulo di mutazioni. Una recente analisi genetica di 24 adenocarcinomi pancreatici ha mostrato come la base genetica della neoplasia sia complessa ed eterogenea. Nello studio condotto da Jones e colleghi sono state identificate in ogni tumore una media di 63 mutazioni genetiche (soprattutto puntiformi), organizzate in dodici vie di trasduzione del segnale, le cui alterazioni sono fondamentali nel processo oncogenetico. Non tutti i tumori presentano alterazioni in tutte le vie e le mutazioni chiave in ogni pathway sembrano differire da tumore a tumore.

Le principali alterazioni comprendevano in particolare:

- mutazioni attivanti l'oncogene KRAS nell'90% dei casi;
- mutazioni inattivanti l'oncosoppressore p16 codificato dal gene CDKN2A in quasi tutti i casi;
- mutazioni inattivanti il gene TP53, codificante l'oncosoppressore p53 nel 60% dei casi;
- delezione del gene SMAD4/DPC4 nel 50% dei casi.

In uno lavoro pubblicato nel 2010, 7 dei 24 pazienti inclusi nello studio di Jones sono stati ulteriormente caratterizzati mediante analisi genomica delle lesioni metastatiche, in seguito a prelievo autoptico. La maggior parte delle alterazioni genetiche rilevate nelle metastasi erano già nella lesione primaria, per cui si trattava di mutazioni "*founder*", presenti prima dell'avvio della malattia metastatica. L'altra classe di mutazioni si configuravano, invece, come "*progressor*", perché esclusive dei cloni metastatici. Ciò conferma come il cancro pancreatico sia determinato da un accumulo di mutazioni genetiche, con progressione da lesioni precursori non invasive con accumulo di mutazioni a carico di KRAS, CDKN2A, TP53 e SMAd4, ad adenocarcinoma duttale invasivo con una media di 63 mutazioni per caso e coinvolgimento dei sopracitati 12 pathway. Il tempo che intercorre tra l'avvio della tumorigenesi e la formazione del clone parentale è di circa dieci anni, altri cinque anni circa sono necessari per la formazione del subclone metastatico e circa due anni trascorrono tra la formazione di quest'ultimo e la morte del paziente, con un'ampia finestra per una possibile diagnosi precoce della neoplasia (11).

Tra le dodici vie individuate, cinque regolano specifiche funzioni cellulari: apoptosi, riparazione di danno al DNA, progressione del ciclo cellulare da fase G1 a fase S, adesione cellula-cellula e

invasione; mentre le altre vie di trasduzione sono cascate di segnali cellulari, divisibili in tre gruppi: pathways di segnalazione embrionali, cascata delle MAP-chinasi e via di trasduzione del segnale mediata dal TGF β (12). In tabella 1 sono riassunte le principali vie di segnale alterate e i geni coinvolti.

Tabella 1: Principali vie di segnale alterate e i geni coinvolti nella neoplasia

Via di segnale coinvolta	Geni alterati
Apoptosi	TP53, CASP10, VCP, CAD, HIP1
Riparazione del DNA	MSH6, MSH3, ERCC2, ERCC3, TP53
Transizione G1/S del ciclo cellulare	CDKN2A, Ciclina D, APC2 FBXW7, CHD1
Adesione cellula-cellula	CDH1, CDH10, PCDHB2
Integrin signaling	ITGA4, ITGA9, LAMA1, FN1, ILK
Vie di segnale embrionali: - via di Notch - via di Hedgehog - via di Wnt	MYC, GATA6, S0X3, WNT9A
c-Jun N-terminal kinase signaling	MAP4K3, TNF, AFT2, NFATC3
KRAS signaling	KRAS, MAP2K4
TGF- β signaling	SMAD4, SMAD3, TGFB2, BMP2
Processi di invasione	ADAM9, ADAM15
Small GTPase-dependent signaling(oltre KRAS)	AGHGEF7, CDC42BPA, PLB3,RP1

1.3 ANATOMIA PATOLOGICA

La classificazione di riferimento dei tumori del pancreas è quella dell'OMS, che si basa su aspetto macroscopico (solido, cistico, intraduttale), linea di differenziazione cellulare (duttale, acinare, endocrina) e profilo immunofenotipico nei casi in cui la differenziazione non risulti evidente dall'aspetto istologico. Lo schema classificativo OMS comprende sia entità rare che forme comuni e loro varianti, che non differiscono per trattamento e probabilmente prognosi. La tabella 2 riporta la classificazione esemplificata delle neoplasie epiteliali del pancreas, che raggruppa il 98% delle neoplasie pancreatiche (13).

Tabella 2 (14)

Entità nosografica	%
<i>Adenocarcinoma duttale</i>	80
<i>varianti del duttale</i>	5
<i>Cistoadenoma sieroso</i>	1
<i>Neoplasia mucinoso cistica</i>	1
<i>Neoplasia intraduttale</i>	5
<i>Carcinoma a cellule acinari</i>	1
<i>Pancreatoblastoma</i>	1
<i>Neoplasia solida-pseudopapillare</i>	1
<i>Neoplasie neuroendocrine</i>	5

Varianti dell'adenocarcinoma duttale sono: carcinoma adenosquamoso, colloide (adenocarcinoma mucinoso non cistico), epatoide, midollare, a cellule ad anello con castone, indifferenziato (anaplastico) e altre forme rarissime, tra cui casi eccezionali di carcinosarcoma in cui è istologicamente documentabile nel tumore una componente mesenchimale.

Sono, inoltre, da ricordare *carcinomi a differenziazione mista*: carcinoma misto duttale-neuroendocrino, acinare-duttale, acinare-neuroendocrino-duttale (15).

Nello specifico l'adenocarcinoma duttale pancreatico origina dalle cellule dell'epitelio duttale, evolvendo da lesioni premaligne a carcinoma invasivo. Nonostante le cellule duttali siano solo il 10-30% del parenchima pancreatico, gli adenocarcinomi duttali costituiscono circa l'80-90% di tutti

i tumori del pancreas esocrino. Lo sviluppo del carcinoma invasivo nel pancreas è un processo graduale e dalle alterazioni precancerose al carcinoma invasivo intercorre circa un decennio, con un'importante opportunità di diagnosi precoce e un notevole impulso alla ricerca dei cambiamenti genetici che avvengono nelle cellule pancreatiche duttali delle lesioni precancerose prima che acquisiscano invasività. In base a numerosi studi è emerso che il cancro del pancreas si sviluppa a partire da tre diversi precursori: *neoplasia intraepiteliale pancreaticata* (PanIn); *neoplasia intraduttale mucinosa papillare*(IPMN); *neoplasia cistica mucinosa* (MCN) (16).

Neoplasia pancreaticata intraepiteliale (PanIN)

La neoplasia pancreaticata intraepiteliale è la più frequente e meglio istologicamente caratterizzata tra le lesioni premaligne che interessano il pancreas. La diagnosi precoce di PanIN, la cui rilevazione clinica risulta difficile, permetterebbe di intervenire ancora prima che un tumore invasivo si sia potuto sviluppare. È di tipico riscontro nei soggetti anziani, con una prevalente localizzazione nella testa, più che nella coda della ghiandola.

Vi sono lesioni presenti nella PanIN che sono in grado di produrre atrofia centro-lobulare del parenchima pancreatico e l'associazione tra metaplasia acinare-duttale e PanIN ha portato a ipotizzare che questa si sviluppi a partire da cellule acinari che subiscono un processo di metaplasia duttale (17).

PanIN insorge nelle cellule epiteliali dei dotti di piccolo calibro (<5mm) e morfologicamente viene ad essere classificata in tre gradi:

- 1)*PanIN di grado 1A e 1B*: lieve forma di displasia, con minima atipia cito-nucleare e mantenuta polarità cellulare;
- 2)*PanIN di grado 2*: presenza evidente di atipie cito-nucleari e scarse mitosi cellulari;
- 3)*PanIN di grado 3*, o carcinoma in situ: si configura come il culmine della progressione displastica. Questa presenta tutte le caratteristiche del cancro, tra cui perdita di polarità, atipie nucleari, mitosi frequenti e gemmazione di gruppi di cellule nel lume. La lesione è tuttavia confinata all'interno della membrana basale, in assenza di crescita invasiva (18).

Analisi molecolari di campioni biotici di PanIN ottenuti da pancreasectomie, hanno evidenziato come la crescente atipia citologica riscontrata nelle lesioni precursori, sia altamente associata all'accumulo di alterazione geniche in specifici geni. Per cui PanIn, che è il precursore microscopico non invasivo dell'adenocarcinoma duttale pancreatico mostra mutazioni genetiche simili a quelle riscontrate nella sua controparte invasiva. L'accorciamento dei telomeri è un evento comune e precoce nella carcinogenesi pancreaticata ed è stato osservato in circa il 90% delle

lesioni PanIN-1A. Altri eventi osservati in Pan-IN a basso grado e quindi classificabili come eventi precoci, sono mutazioni a carico di KRAS (circa 20% dei casi di PanIN-1A), di CDKN2A/p16 (30%, 50% 70% di PanIN1, PanIN2, PanIN3), di GNAS o di BRAF. Eventi tardivi osservati in forme di PanIN ad alto grado e nel carcinoma invasivo includono alterazioni a carico dei geni SMAD4 e TP53, che pertanto vengono considerati difetti genetici più tardivi, che contribuiscono alla transizione tra carcinoma in situ e carcinoma invasivo. (19)

La **figura 1** mostra la progressione delle alterazioni molecolari nei vari gradi di lesione (19):

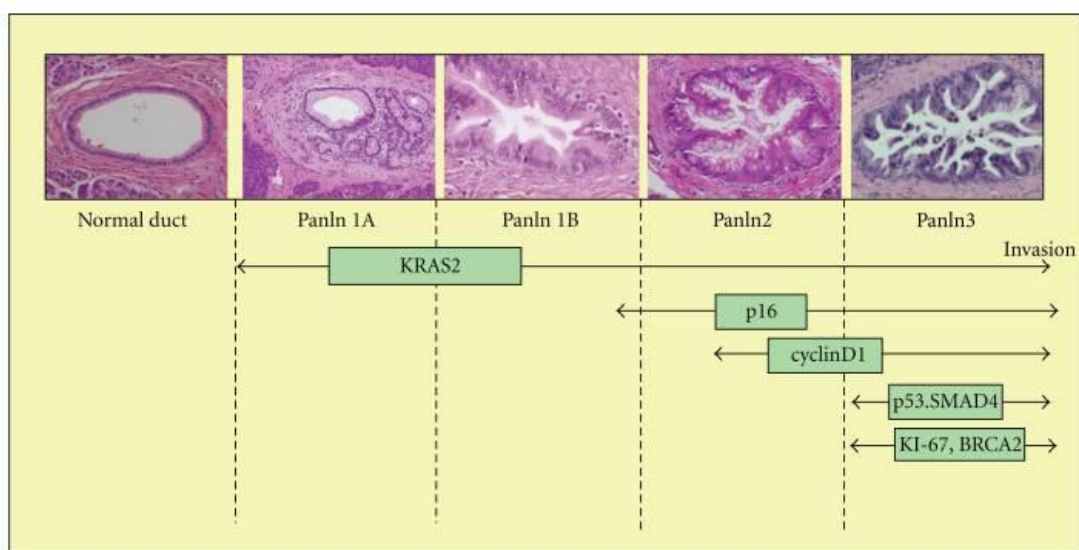


Fig. 1: Progressione delle alterazioni molecolari PanIN

Neoplasia Intraduttale Papillare Mucinoso (IPMN)

Le neoplasie intraduttali papillari mucinose (IPMN) del pancreas rappresentano il 5% delle neoplasie del pancreas esocrino, con insorgenza nella testa dell'organo nel 70% dei casi. La neoplasia intraduttale papillare mucinosa (IPMN) è una neoplasia cistica che origina dalle cellule epiteliali che rivestono il sistema duttale pancreatico. È caratterizzata da proliferazione di cellule che formano proiezioni papillari e da secrezione di mucina che determina la formazione di una dilatazione cistica. Interessano prevalentemente pazienti intorno ai 60-70 anni, senza differenze significative tra sesso maschile e femminile. Gli IPMN è un'entità patologica recentemente definita e sono oggi in fase di esplosione epidemiologica, rappresentando le neoplasie cistiche del pancreas più comuni, con un numero di diagnosi, specialmente incidentali in corso di TAC e risonanza magnetica addominale, in costante aumento. Nonostante il trattamento sia principalmente di carattere chirurgico, alcuni studi hanno evidenziato come ci si possa limitare ad un attento follow-

up in caso di soggetti asintomatici, anziani e/o ad alto rischio chirurgico, oppure quando sia coinvolto il solo sistema duttale secondario. Gli IPMN sono caratterizzate dalla proliferazione di cellule mucinose che formano proiezioni papillari all'interno dei dotti pancreatici (calibro >1cm), che sono tipicamente dilatati (dilatazioni cistiche) e contengono aggregati di mucina.

Gli IPMN sono classificate in tre categorie, differenti non solo dal punto di vista morfologico, ma anche dal punto di vista biologico e prognostico:

- *MD-IPMN (MAIN DUCT IPMN)*: ad alto potenziale aggressivo (fino al 60-70%), con una percentuale di carcinoma invasivo intorno al 40%. La dilatazione del dotto principale è >5 mm e può essere segmentaria o generalizzata (in questo caso la neoplasia si definisce panduttale);
- *BD-IPMN (Branch Duct IPMN)*: a basso-medio potenziale aggressivo (fino al 20-25%), con una percentuale di carcinoma invasivo intorno al 10%. Originano in rami secondari del dotto principale con cisti di diametro > 5mm e spesso multifocali (multiple dilatazioni cistiche segmentarie in porzioni diverse del pancreas);
- *Mixed Type IPMN*: presentano entrambe le caratteristiche delle 2 tipologie principali, per cui è presente simultaneo coinvolgimento neoplastico del dotto principale e dei dotti secondari. La componente periferica degli IPMN di questo gruppo è molto spesso multifocale (Fig.2)

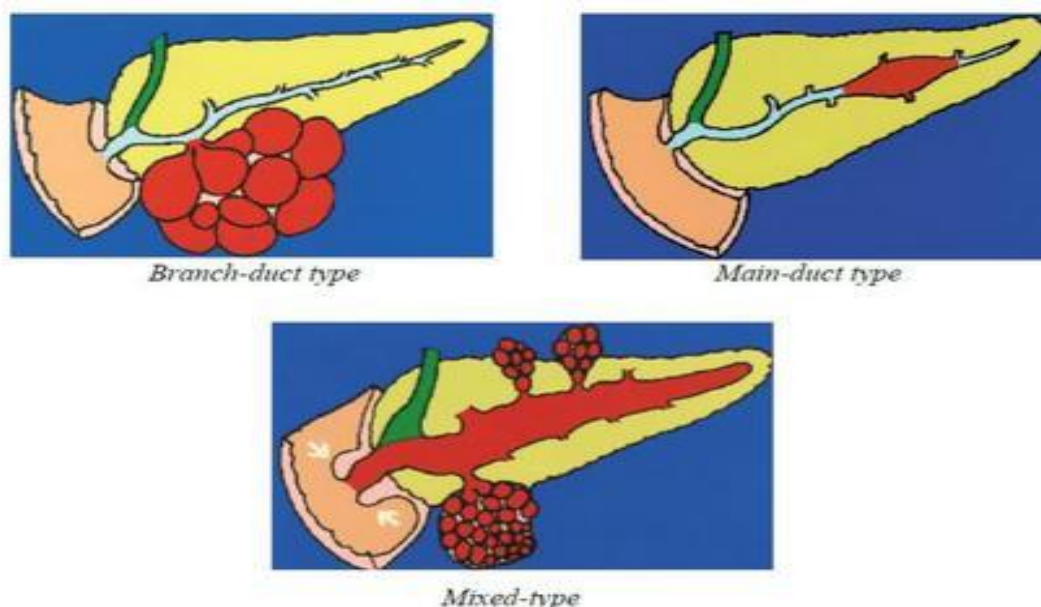


Fig. 2: Schema della classificazione macroscopica del IPMN

Dal punto di vista istologico possono distinguersi quattro sottotipi di cellule nell'epitelio papillare dell'IPMN: *gastrico, intestinale, pancreatico--biliare ed oncocitico* (20) (Fig. 3):

- *Papille di tipo intestinale;*
- *Papille di tipo bilio-pancreatico;*
- *Papille di tipo gastrico;*
- *Papille di tipo oncocitico.*

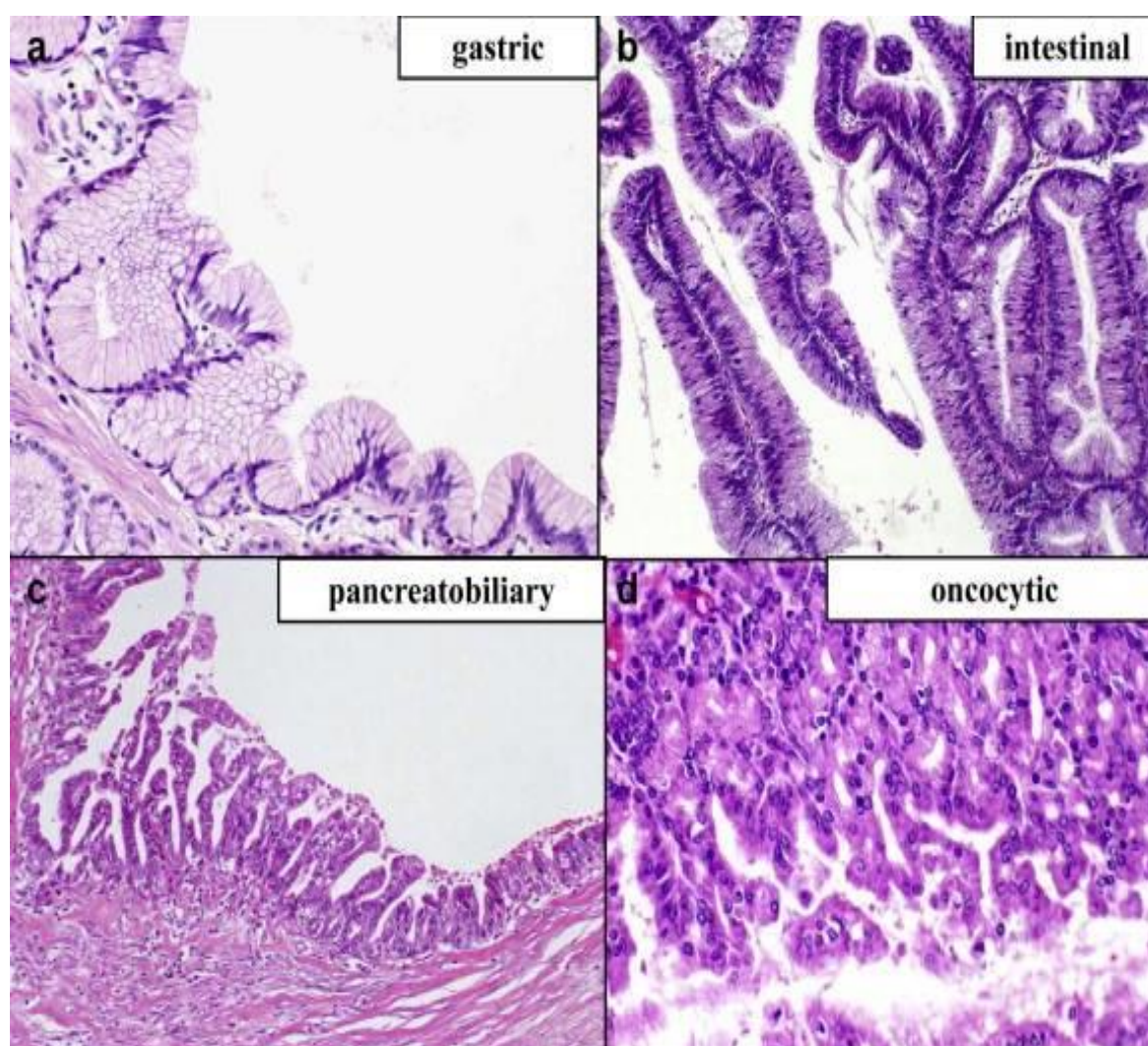


Fig. 3: Classificazione istologica di IPMN

Le cellule della componente papillare degli IPMN hanno un significato clinico-patologico. Gli IPMNs di tipo gastrico (30%-40% dei casi) esprimono i markers della linea cellulare gastrica, MUC5AC e MUC6 positive e MUC1-MUC2-CDX2 negative, e sono per lo più appartenenti alla

categoria BD-IPMN. L'evoluzione verso le forme di carcinoma invasivo sono un evento non comune (15% dei casi), ma qualora si verifichi tale eventualità si avrà solitamente l'insorgenza della varietà classica, aggressiva di adenocarcinoma duttale pancreatico. Gli IPMN di tipo intestinale (30%-40% dei casi), solitamente MD-IPMN, hanno una spiccata similitudine con le strutture villose degli adenomi del colon ed esprimono il marcatore intestinale CDX2 (specifico gene di programmazione cellulare di tipo intestinale, con funzione di soppressore tumorale) e MUC2 (glicoproteina di tipo intestinale prodotta esclusivamente dalle cellule intestinali tipo goblet, con funzione di soppressore tumorale). Le neoplasie con questi caratteri possono coinvolgere estesamente il sistema duttale e raggiungere dimensione cospicue, ma anche quando si associano a trasformazione carcinomatosa, presentano un andamento clinico indolente. Il carcinoma, infatti, è quasi sempre di tipo colloidale, con espressione dello stesso fenotipo non aggressivo: negatività per MUC1 e positività per MUC2 e CDX2.

Nel caso degli IPMN di tipo bilio-pancreatico (20% dei casi), le papille hanno architettura più complessa e ramificata, un rivestimento epiteliale sovrapponibile a quello osservato nel carcinoma pancreatico e delle vie biliari, non esprimono MUC2 e CDX2, mentre esprimono MUC1. Queste neoplasie sono caratterizzate da displasia ad alto grado e frequentemente associate a carcinoma infiltrante con caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche sovrapponibili all'adenocarcinoma duttale classico. Le mucine MUC1, considerate marcatori di aggressività biologica, sono una famiglia di glicoproteine di membrana con un ruolo importante in molte funzioni essenziali, tra queste: mantenere l'integrità del lume ghiandolare, regolare l'interazione tra cellula-cellula, cellula-stroma e conferire immunoresistenza. Gli IPMN di tipo oncocitico sono entità più rare: in questo caso le papille sono caratterizzate da epitelio rivestito da cellule con intenso citoplasma granulare eosinofilo, con espressione immunofenotipica prevalentemente negativa per le mucine o con espressione solo focale delle stesse. (20).

Masuda e colleghi hanno condotto uno studio retrospettivo su 101 pazienti allo scopo di determinare il rapporto tra l'espressione di MUC2 negli IPMN e l'insorgenza di una displasia ad alto grado, analizzando la reattività immunoistochimica di vari anticorpi anti-mucina. Dallo studio è emerso che la prevalenza di displasia ad alto grado, con conseguente sviluppo di carcinoma invasivo è molto più alta negli IPMN di tipo intestinale, MUC2 positive rispetto agli IPMN di tipo gastrico MUC2 negative. L'espressione di MUC2 può quindi fornire adeguate indicazioni chirurgiche. (21)

Il quadro molecolare negli IPMN si presenta complesso. I quattro geni chiave che risultano mutati nell'adenocarcinoma duttale pancreatico, possono ritrovarsi alterati nei casi di IPMN:

- mutazioni somatiche di *KRAS* sono osservate in una percentuale di casi variabile dal 30% all'80% e sono più comuni in IPMN con displasia ad alto grado o invasivi;
- mutazioni somatiche di *TP53* sono rilevate in aree con displasia ad alto grado e *P53* è sovraespresso in IPMNs con displasia ad alto grado e carcinoma;
- l'espressione di *SMAD4* è preservata nella maggior parte degli IPMNs non invasivi, ma è persa in un terzo delle IPMNs invasive;
- l'espressione di *p16* è persa sia nelle forme invasive che non invasive (22).

Inoltre nel 60% dei casi di IPMN (sia nelle forme in situ che invasive) sono documentate mutazioni somatiche a carico dell'oncogene *GNAS* (codone 201), guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha, che codifica una proteina coinvolta nella regolazione dell'attività dell'adenilato ciclasi nei pathways di trasduzione del segnale. Alterazioni in *GNAS* comportano un'attivazione costitutiva di questa enzima con conseguente aumento della proliferazione cellulare. Le mutazioni a carico di *GNAS* sono assenti negli adenocarcinomi duttali pancreatici non IPMN-correlati, con la maggiore prevalenza osservata nelle forme di IPMN con istotipo intestinale. Wu e colleghi effettuando il sequenziamento di 169 geni comunemente alterati nelle neoplasie umane, mediante l'esame del fluido cistico di 19 IPMN, hanno osservato che in più del 95% dei casi di IPMN, *KRAS* e *GNAS* risultano mutati ma solo in circa il 50% dei casi sono mutati entrambi. Inoltre mutazioni di *GNAS* non sono state rilevate in altre neoplasie cistiche del pancreas e come già detto nelle forme di adenocarcinoma duttale pancreatico non IPMN correlate e sono quindi un elemento chiave per la diagnosi e la gestione di pazienti con lesioni cistiche del pancreas (23).

Wu e colleghi attraverso il whole-exome sequencing di 8 IPMN, hanno rilevato una media di circa 26 mutazioni somatiche per tumore, tra cui anche mutazioni somatiche a carico di *RNF43* (75% dei casi), un probabile gene oncosoppressore mappato sul cromosoma 17q che codifica una E3 ubiquitina ligasi (24).

Sono stati inoltre osservati aumentati livelli di espressione di micro-Rna (*miR-21*, *miR-221*, *miR-17-3p*). I micro-Rna nel fluido cistico sono inoltre utili per la diagnosi differenziale di forme a basso grado da forme ad alto grado di IPMN e per distinguere IPMN ad alto grado da cistoadenoma sieroso, neoplasia pseudopapillare e tumori neuroendocrini pancreatici cistici (25).

Altri studi (Furukawa e colleghi) hanno analizzato le modificazioni morfologiche delle papille in relazione all'oncosoppressore *DUSP6*, per rilevare eventuali associazioni fra la perdita di funzione di questo gene nell'IPMN e la progressione a carcinoma invasivo e si è evidenziato come non vi sia una stretta associazione fra mutazioni di *DUSP6* nelle lesioni IPMN e lo sviluppo del carcinoma.

Sembra che lo sviluppo di IPMN sia indipendente dalla perdita dei pathway di geni oncosoppressori e che l'evento maggiormente responsabile dell'evoluzione a carcinoma invasivo sia la mutazione dell'oncogene KRAS (26).

Neoplasia cistica mucinosa (MCN)

L' MCN è tipicamente un tumore riscontrabile nel sesso femminile (95%), con prevalenza in età pre-menopausale, localizzato più frequentemente a livello del corpo-coda (75%) e di dimensioni variabili da 2 a 25 cm. Si può presentare in forma multi- o uni-loculare, con liquido viscoso e mucina all'interno. A livello microscopico è costituito da epitelio formato da cellule mucinose colonnari con atipia variabile, che può essere supportato da uno stroma densamente cellulato, detto "ovarian-like" (Fig.4). Si può presentare in forma benigna, borderline o maligna e la forma maligna evolve in cistoadenocarcinoma mucinoso invasivo nel 60% dei casi in un tempo medio di circa 9 anni. Il rischio di trasformazione maligna di tale tumore rende sempre consigliabile la resezione chirurgica (27).

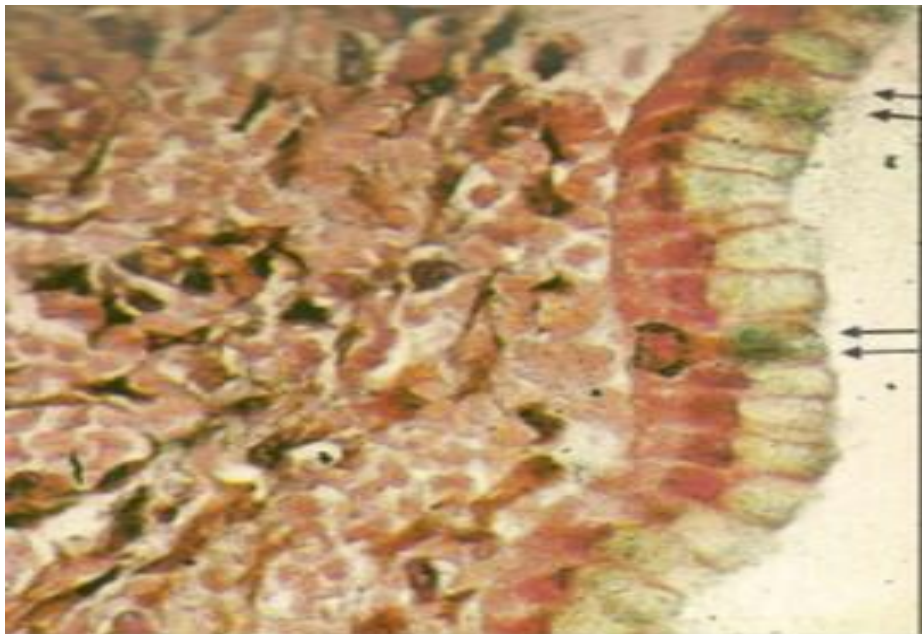


Fig. 4: Neoplasia cistica mucinosa MCN

Adenocarcinoma duttale invasivo

L' adenocarcinoma duttale pancreatico si presenta sotto un profilo macroscopico come una massa solida mal definibile, di consistenza dura e aspetto stellato, bianco-grigiastro, spesso circondate da un quadro di pancreatite sclerosante. Il 60%-70% dei tumori si localizza a livello della testa

dell'organo/processo uncinato, mentre il 10-15% trae origine dal corpo e il restante 10-5% dalla coda del pancreas. La localizzazione cefalica causa nella maggior parte dei casi un'ostruzione del coledoco distale, con comparsa precoce di ittero, mentre i tumori del corpo coda non interessando il sistema biliare, rimangono silenti più a lungo rispetto ai tumori della testa, dando segno di sé negli stadi più avanzati di malattia. Questo tumore è caratterizzato da una densa fibrosi stromale (definita come reazione desmoplastica), nella cui formazione e turnover giocano un ruolo chiave cellule pancreatiche miofibroblastiche stellate. Tali cellule, attivate da fattori di crescita quali TGF β 1, PDGF, FGF, secernono collagene e altre componenti della matrice extracellulare, regolando il riassorbimento e il turnover dello stroma attraverso la produzione di metallo proteinasi. Inoltre le cellule stellate appaiono responsabili anche della scarsa vascolarizzazione che caratterizza l'adenocarcinoma duttale pancreatico (4). Le cellule stromali esprimono proteine quali, ciclossigenasi-2, recettori per PDGF, VEGF, SCDF, chemochine, integrine, SPARC e altri elementi associati con una prognosi peggiore e resistenza al trattamento. Queste proteine sono oggetto di un'attenzione sempre crescente, in quanto possibili bersagli di nuove terapie target. Controverso è invece il ruolo della neoangiogenesi nel tumore pancreatico. Nonostante dati recenti suggeriscano che lo sviluppo di tale tumore sia dipendente da questo processo, come molti altri tumori solidi, trattamenti effettuati con inibitori della neoangiogenesi si sono rivelati fallimentari (28).

Secondo uno studio effettuato da Olive e colleghi su modelli murini, agendo su vie di segnale stromali si assiste ad un aumento della diffusione dei chemioterapici nel tumore e quindi ad una maggior efficacia di questi. (4)

Tra le popolazioni cellulari del tumore è stato identificato un sottogruppo con proprietà di cellule staminali. Questa popolazione costituisce circa l'1-5% della massa tumorale ed è dotata della capacità di auto-rinnovo illimitato; mediante divisioni asimmetriche esse possono dare origine a cellule più differenziate. Le cellule staminali del tumore pancreatico sono resistenti alla chemioterapia e alla radioterapia, e questo potrebbe spiegare il motivo per cui i trattamenti non sono in grado di curare in maniera definitiva la malattia. Un forte interesse si sta avviando attorno a questa popolazione cellulare alla ricerca soprattutto di target molecolari da sfruttare terapeuticamente per colpire tali cellule (4).

1.4 BIOLOGIA MOLECOLARE DELL' IPMN

Dal punto di vista molecolare, le IPMN si distinguono dal carcinoma duttale per ridotta incidenza di mutazioni di KRAS (che rappresenta comunque l'alterazione genetica più frequente, con una prevalenza dell'80%), p53, p16, per conservazione dell'espressione di DPC4 e per inattivazione in un terzo dei pazienti del gene STK1/LKB1. KRAS codifica per una proteina G, o proteina legante un nucleotide della guanosina, che funge da GTPasi e media la via di segnale intracellulare MAPK/ERK a valle di recettori di fattori di crescita (29,30).

Mutazioni missenso determinano l'attivazione costitutiva di KRAS e incorrono principalmente al codone 12 e, in misura minore, ai codoni 13 e 61(29).

Le mutazioni di KRAS sono rilevate in tutti i sottotipi istologici di IPMN, ma sono maggiormente presenti nei tipi gastrico e pancreatico--biliare. Inoltre, Nikiforova e altri (29) hanno rilevato che le mutazioni di KRAS nelle IPMN sono associate alla localizzazione preferenziale ai dotti secondari.

In associazione a KRAS, il 65% delle IPMN sviluppa mutazioni somatiche dell'oncogene GNAS, che codifica per una proteina G attivante la subunità α (Gsa α). Le mutazioni di GNAS al codone 201 o 227 determinano attivazione costitutiva di Gsa α e del suo effettore, un'adenilato ciclasi, che porta alla sintesi autonoma di cAMP e ad un segnale di crescita incontrollato (30,31).

Le mutazioni di GNAS sono tipicamente presenti nelle IPMN che coinvolgono il dotto 40 pancreatico principale e che appartengono al sottotipo istologico intestinale.

Nel complesso, le mutazioni di KRAS e/o GNAS sono presenti in più del 96% delle IPMN e sono considerati eventi precoci durante la tumorigenesi¹¹⁴. Le mutazioni inattivanti il gene soppressore tumorale RNF43 pervengono nel 14--38% delle IPMN, con frequente perdita dell'eterozigosi al locus RNF43 sul cromosoma 17q (31). RNF43 codifica per una ubiquitina ligasi E3 che regola la via di segnale Wnt. Altri potenziali geni mutati includono TP53, PIK3CA, PTEN, CDKN2A e SMAD4. Mutazioni di TP53 sono eventi tardivi nella progressione delle IPMN e sono frequentemente ritrovate nella neoplasia avanzata (32). Allo stesso modo, G. Carracedo e colleghi (33) hanno scoperto che mutazioni di PIK3CA e delezioni di PTEN sono fortemente associate ad IPMN di alto grado e PDAC. Perdite a livello di CDKN2A sono ritrovamenti poco comuni, prevalenti nelle IPMN con displasia di alto grado piuttosto che di basso grado (34,35). Analogamente, SMAD4 è di raro inattivato nelle IPMN di basso grado, ma la sua mutazione con conseguente perdita dell'eterozigosi ricorre tipicamente nelle neoplasie avanzate (34,35). L'IPMN presenta eterogeneità morfologica e immunofenotipica tale per cui il processo di trasformazione

neoplastica deve passare attraverso specifici programmi di transdifferenziazione intestinale (IPMN di tipo indolente) o pancreato-biliare (IPMN di tipo aggressivo). Anche il carcinoma associato alle IPMN è eterogeneo per immunofenotipo, anche per quanto riguarda l'espressione di DPC4/SMAD4, gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 18q. Mentre DPC4 è costantemente espresso nei carcinomi colloidali MUC2 e CDX2 positivi, la delezione del cromosoma 18q e la perdita di funzione del gene DPC4 caratterizza invece in eguale proporzione (50%) sia gli adenocarcinomi classici, sia i carcinomi tubulo--ghiangulari MUC1 positivi, insorti nelle IPMN. Poiché l'espressione di DPC4 nei carcinomi duttali correla con una prognosi migliore è possibile ipotizzare che anche la buona prognosi di queste neoplasie sia, almeno in parte, riconducibile alla mantenuta espressione di DPC4.

Da studi di profilo di espressione genica, la variante infiltrante delle IPMN si caratterizza per la selettiva espressione di quattro geni: claudina 4, CZCR4, S100A4 e mesotelina. In particolare, S100A4 e mesotelina sono presenti nel 73% delle neoplasie invasive ed in nessuna delle IPMN non invasive. Per la variante oncocitica dell'IPMN, in considerazione dell'eccessivo accumulo di mitocondri, si ipotizza una carcinogenesi distinta e verosimilmente riconducibile a stress ossidativi. Il carcinoma invasivo non presenta anomalie dei geni soppressori tumorali p53, p16 e SMAD4/DPC4.

Tabella 3 Mutazioni genetiche chiave e/o delezioni nelle cisti pancreatiche

Pancreatic Cyst Type	KRAS	GNAS	RNF43	VHL	CTNNB1	TP53	PIK3CA	PTEN	CDKN2A	SMAD4
Intraductal papillary mucinous neoplasm	+	+	+	–	–	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
Mucinous cystic neoplasm	+	–	–	–	–	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
Serous cystadenoma	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Solid-pseudopapillary neoplasm	–	–	–	–	+	+ ^b	+ ^b	–	–	–
Non-neoplastic cysts	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

2. GESTIONE TERAPEUTICA DELL' ADENOCARCINOMA PANCREATICO

2.1 TRATTAMENTO CHIRURGICO

Nonostante i numerosi progressi nella terapia del cancro pancreatico, attualmente l'intervento chirurgico radicale è l'unico in grado di offrire un vantaggio concreto in termini di sopravvivenza globale. La sopravvivenza a cinque anni nei pazienti dove è possibile effettuare una chirurgia radicale si attesta intorno a valori del 15-25%; sfortunatamente solo il 10-20% dei pazienti a cui viene diagnosticata questa neoplasia risultano candidabili all'intervento. Diversi sono i fattori prognostici associati a una migliore sopravvivenza dopo pancreasectomia: assenza di metastasi linfonodali, diametro del tumore <2cm o comunque neoplasia confinata a livello pancreatico e tumore ben differenziato (G1). Importante fattore prognostico è anche il *LNR* (lymphnode ratio), cioè il rapporto tra linfonodi metastatici/ linfonodi totali asportati. La mortalità associata a chirurgia pancreatico si è progressivamente ridotta nel tempo raggiungendo una percentuale minore al 5%, qualora venga eseguita in centri ad "alto volume" ad essa dedicati. Oltre a un'accurata stadiazione clinico-radiologica, nella scelta di avviare o meno un paziente alla chirurgia è importante effettuare anche un adeguato bilancio tra benefici e fattori di rischio, correlati soprattutto con le caratteristiche della neoplasia, le comorbidità e l'aspettativa di vita del soggetto. Le principali limitazioni all'intervento chirurgico legate al paziente sono costituite dall'età (che non costituisce una controindicazione assoluta all'intervento, ma è indice di maggiore frequenza e severità di comorbidità associate), il tasso di complicanze e l'aspettativa di vita del paziente. (36)

Tra i parametri associati alla neoplasia risulta fondamentale la valutazione preoperatoria dell'estensione anatomico-clinica di malattia; le indagini radiologiche stadiali devono fornire adeguate informazioni che consentano di definire se sono soddisfatti o meno i criteri di resecabilità. Tali criteri non sono stati codificati a livello internazionale, pertanto si riscontra una certa disomogeneità nell'impiego di tali parametri nei diversi centri e per tale motivo sarebbe auspicabile coinvolgere un team multidisciplinare con la partecipazione di un radiologo per valutare l'estensione della malattia. Tuttavia alcuni di questi risultano universalmente riconosciuti, in particolare: diametro della massa neoplastica inferiore a 5 cm, assenza di invasione extrapancreatica (eccetto duodeno e via biliare), assenza di occlusione/stenosi/ispessimento dei maggiori vasi peripancreatici, assenza di metastasi ematogene e/o carcinosi peritoneale. Uniformemente riconosciuti

come distintivi di non resecabilità sono, invece, i seguenti criteri: presenza di metastasi a distanza (es. fegato, peritoneo, polmone/pleura), presenza di metastasi linfonodali distanti dal campo “chirurgico” (es: linfonodi mediastinici o sovraclaveari, linfonodi interaortocavali/periaortici), infiltrazione di visceri extrapancreatici (ad eccezione di duodeno e vie biliari). (37)

Per quanto riguarda l’infiltrazione dei vasi peripancreatici possono essere identificate tre diverse situazioni (38):

Malattia resecabile:

- assenza di adesione/infiltrazione a carico dell’asse venoso spleno-porto-mesenterico e dei vasi arteriosi (tripode celiaco, arteria mesenterica superiore, arteria epatica);

Malattia borderline resectable:

- adesione o infiltrazione $< 180^\circ$ dell’asse venoso spleno-porto-mesenterico con possibilità di resezione tangenziale o resezione a pieno canale e ricostruzione del vaso;
- infiltrazione dell’arteria gastroduodenale fino all’origine dall’arteria epatica;

Malattia localmente avanzata:

- infiltrazione $> 180^\circ$ o occlusione dell’asse venoso spleno-porto-mesenterico, presenza di trombosi portale;
- infiltrazione del tripode celiaco, arteria mesenterica superiore, arteria epatica, vena cava inferiore, aorta.

L’infiltrazione $< 180^\circ$ dell’arteria mesenterica superiore o di un “breve tratto” dell’arteria epatica, oppure l’infiltrazione $> 180^\circ$ dell’asse venoso spleno-porto-mesenterico, vengono da alcuni autori considerati come criteri per definire una neoplasia “borderline resectable”, suscettibile pertanto di intervento chirurgico di resezione e ricostruzione vascolare. Due metanalisi hanno però dimostrato che tali procedure sono associate a una significativa mortalità e morbidità postoperatoria e non conferiscono alcun vantaggio in termini di sopravvivenza a distanza. (39,40)

È stato inoltre valutato il possibile approccio chirurgico di resezione arteriosa nei casi di cancro pancreatico localmente avanzato infiltrante l’arteria epatica, il tronco celiaco e l’arteria mesenterica superiore. I risultati hanno evidenziato un OS pari a quello della resezione standard e migliore rispetto al trattamento palliativo, ma con significativamente più elevato tasso di morbidità e mortalità, limitando il complessivo benefit oncologico. (41)

Nonostante un notevole miglioramento nelle metodiche di diagnosi e stadiazione nel corso degli anni, in un certo numero di pazienti giudicati resecabili emergono situazioni di inoperabilità al momento della laparotomia. Infatti secondo recenti casistiche circa un paziente su 10 con staging TC negativo avrà malattia non resecabile, soprattutto per il reperto intraoperatorio di interessamento peritoneale, metastasi epatiche superficiali e piccole e coinvolgimento vascolare. Pertanto nei casi dubbi può essere utile l'impiego della laparoscopia diagnostica a scopo esplorativo preoperatoria, soprattutto per identificare una disseminazione peritoneale o la presenza di metastasi epatiche superficiali (42).

2.2 TRATTAMENTO RADIOTERAPICO

Radioterapia a campi esterni

Fatta eccezione per i rari casi di trattamento palliativo delle metastasi ossee, la radioterapia per il carcinoma del pancreas viene quasi sempre inserita in schemi di trattamento integrato chemio-radioterapico. Infatti attualmente la radioterapia (RT) viene erogata con l'impiego simultaneo di chemioterapici radiosensibilizzanti, come la Gemcitabina o il 5-Fluorouracile, ed è preceduta da una fase di induzione chemioterapica. (43)

Prima di cominciare la RT è necessaria un'adeguata pianificazione del trattamento per elaborare i piani di cura. Il volume della RT a campi esterni comprende il letto tumorale, i linfonodi peripancreatici e quelli para-aortici fra l'undicesima vertebra toracica e la terza lombare. In caso di RT post-operatoria è estremamente importante una corretta inclusione delle anastomosi chirurgiche, potenziali aree di malattia residua. Il trattamento radioterapico del tumore pancreatico presenta notevoli problematiche legate soprattutto alla posizione anatomica dell'organo, che espone gli organi vicini ad una certa dose radiante. Per cercare di ridurre tale tossicità, la RT viene convenzionalmente frazionata (1,8-2 Gy / frazione per 5 giorni alla settimana con dose totale da 50 a 55 Gy). Le dosi impiegate variano da 50 fino a un massimo di 70 Gy in base alla densità della malattia microscopica; irradiare l'area pancreatica a dosi superiori può risultare molto pericoloso per la salute del paziente. (44)

Le principali tossicità legate alla RT si possono distinguere:

- *Acute*: nausea, vomito, anoressia, disidratazione.
- *Tardive*: gastroduodenite, ulcere, enteriti attiniche, rischio di mielite e severa disfunzione epatica e renale la cui incidenza e gravità sono in rapporto all'estensione dei campi di RT e alla dose erogata.

Per poter limitare al minimo gli effetti tardivi della RT è importante una corretta valutazione dosimetrica, un'adeguata pianificazione del massimo volume di destinazione e un'adeguata protezione delle strutture e dei tessuti normali. (45)

La RT a campi esterni viene utilizzata soprattutto nel trattamento adiuvante del cancro pancreatico, in particolare dopo intervento chirurgico terminato con infiltrazione della trancia di resezione (R1). Recentemente sono stati avviati diversi protocolli sperimentali in cui la RT viene impiegata come parte della terapia neoadiuvante sia negli stadi resecabili, come il protocollo EUDRACT in corso nel nostro istituto che combina gemcitabina a basse dosi ad intento chemiosensibilizzante e radioterapia, che nella malattia localmente avanzata.

IORT: radioterapia intraoperatoria

La IORT è una tecnica che permette di irradiare i tessuti tumorali o peritumorali, che possono contenere cellule neoplastiche residue responsabili delle recidive locali, direttamente durante l'atto chirurgico. Questa modalità di erogazione della RT consente un maggior risparmio delle strutture radiosensibili circostanti incluse nel volume tumorale mediante schermatura o mobilitazione temporanea al di fuori del campo della RT. Pertanto è possibile somministrare elevate dosi di radiazioni ionizzanti direttamente sui tessuti esposti chirurgicamente riducendo la tossicità attinica e aumentando le probabilità di controllo loco-regionale.

La IORT è stata valutata a livello sperimentale sia nel trattamento degli adenocarcinomi duttali inoperabili, sia nei casi operabili. Per quanto concerne i primi, vari studi hanno mostrato come questa tecnica consenta di migliorare il controllo locale senza significative tossicità, ma non è in grado di dare nessun vantaggio in termini di sopravvivenza. Inoltre la IORT si è dimostrata efficace nel controllo rapido e duraturo del dolore viscerale nei tumori inoperabili. I dati relativi all'impiego della IORT nel trattamento dei tumori operabili attualmente disponibili indicano che essa può essere associata a chirurgia radicale senza un aumento della morbidità e della mortalità. Il National Cancer Institute ha eseguito uno studio randomizzato in cui i pazienti venivano trattati con IORT o con RT a campi esterni (dose di 45-50 Gy). I pazienti sottoposti a IORT hanno mostrato una sopravvivenza mediana di 18 mesi con tasso di recidiva del 33%, mentre i pazienti sottoposti a RT a campi esterni presentavano una sopravvivenza mediana di 12 mesi con tasso di recidiva del 100%. Sebbene gli studi disponibili mostrino risultati incoraggianti dall'impiego di questa metodica nella terapia del tumore pancreatico, attualmente non è possibile trarre alcuna conclusione sul suo effetto in termini di sopravvivenza e la IORT rimane in quest'ambito una metodica in fase di sperimentazione. (46)

2.3 TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO

L'impiego della chemioterapia (CT) trova il suo principale campo di applicazione nel trattamento dei pazienti che presentano malattia localmente avanzata inoperabile e/o metastatica. Come risulta da alcuni studi randomizzati il trattamento chemioterapico migliora significativamente la sopravvivenza se confrontato con il "best supportive care". Inoltre la CT sistemica (embricata a radioterapia nelle maggior parte degli schemi terapeutici) trova indicazione come trattamento adiuvante dopo intervento chirurgico ad intento radicale, o come trattamento neoadiuvante prima della chirurgia. Gli end-point primari del trattamento chemioterapico sono identificabili con *time to progression* (TTP, tempo di progressione), *overall survival* (OS, sopravvivenza globale), il tipo e il tasso di regressioni obiettive secondo i criteri WHO, *clinical benefit response* (CBR, beneficio clinico). (47)

Per quanto riguarda i farmaci da impiegare, pochi si sono dimostrati attivi.

Gemcitabina (GEM)

Attualmente la Gemcitabina (2'-2'-difluorodeossycidina) è considerato il farmaco di prima linea nel trattamento dell'adenocarcinoma duttale pancreatico in fase avanzata o metastatica, da sola o in associazione ad altri farmaci. Essa è un analogo nucleotidico appartenente alla famiglia degli antimetaboliti e si presenta come un pro-farmaco che necessita di attivazione in due metaboliti fosforilati attivi dall'enzima *deossicitidina chinasi*: la *gemcitabina difosfato* (dFdCPT) e la *gemcitabina trifosfato*. Il primo metabolita inibisce la *ribonucleotide reduttasi*, bloccando la sintesi della *deossicitidina trifosfato* (dCPT), mentre il secondo inibisce la sintesi di DNA mediante un meccanismo di competizione diretta con il dCPT per l'incorporazione nei filamenti di DNA. L'inclusione di questi metaboliti della GEM nel DNA causa la così detta *masked chaintermination* che nasconde *GEM trifosfato* all'azione di rimozione degli enzimi di riparazione, rallentando gravemente la riparazione del DNA e promuovendo l'apoptosi. Inoltre questo farmaco è in grado di autopotenziare la sua attività, poiché la *GEM-difosfato* riduce indirettamente l'inibizione dell'enzima *deossicitidina chinasi* responsabile dell'attivazione del profarmaco. I metaboliti di- o tri-fosfati della GEM inibiscono direttamente o indirettamente gli enzimi della deaminazione e le fosfatasi intracellulari che sono coinvolti nella clearance cellulare della GEM. Questi meccanismi rendono ragione della persistenza della Gemcitabina ad elevati livelli per lunghi periodi all'interno delle cellule neoplastiche. La GEM viene anche impiegata come potente agente radiosensibilizzante nel contesto del trattamento radioterapico; quest'attività potrebbe essere correlata alla deplezione

intracellulare di nucleotidi causata dalle GEM, anche a concentrazioni tissutali molto basse. Le principali forme di resistenza al farmaco sono legate all'incapacità delle cellule neoplastiche di convertirlo nella forma nucleotidica per alterazioni a carico della *desossicitidina chinasi*. Il farmaco viene somministrato per via endovenosa a dosaggio tradizionale di 1000 mg/m²/sett in infusione di 20 minuti per sette settimane consecutive, seguite da una settimana di intervallo e quindi prosecuzione per tre settimane consecutive seguite da una di riposo. I principali effetti avversi del farmaco sono legati alla mielosoppressione; altri effetti tossici includono la nausea, il vomito, alopecia, eruzioni cutanee. (48,49)

Discusso è anche il possibile ruolo prognostico dei livelli di espressione dell'*human equilibrative nucleoside transporter 1*, *hENT1*, necessario per l'uptake del farmaco. La metanalisi di Zhu e colleghi ha concluso che alti livelli di espressione di hENT1 è associato a un incremento dell'OS e della DFS nei pazienti trattati con gemcitabina e quindi anche se sono ad oggi necessari ulteriori trials clinici e procedure standardizzate di immunohistochemica, la valutazione dei livelli di espressione di hENT1 sembra essere un promettente biomarker per definire precocemente la risposta alla gemcitabina e la prognosi dei pazienti affetti da cancro pancreatico (50) (Fig.5).

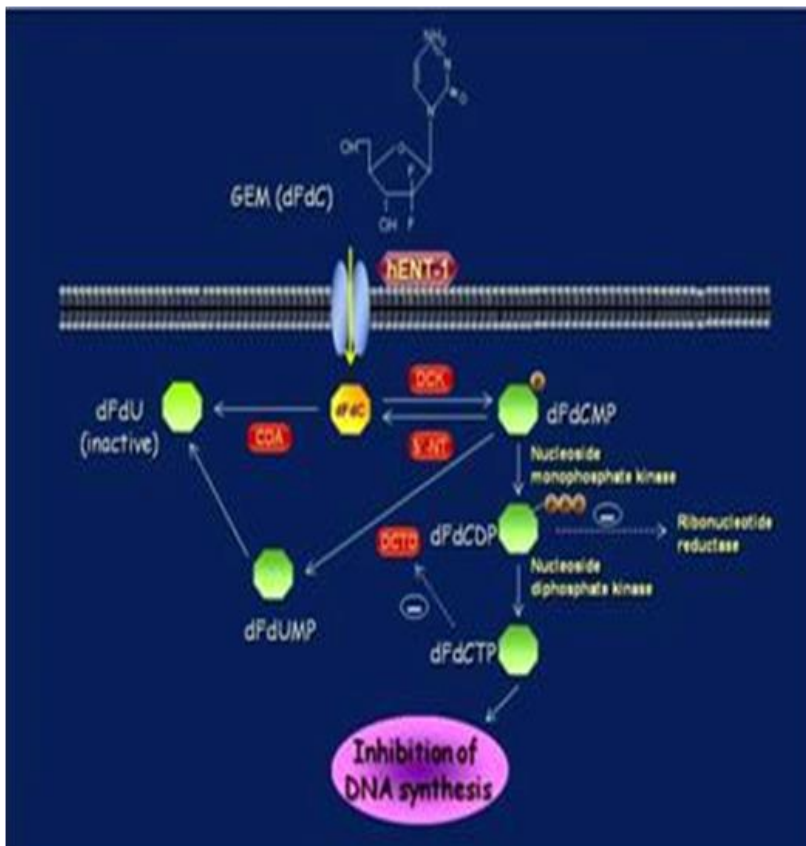


Fig. 5 hENT-1

5-Fluorouracile (5-FU)

Il 5-FU, da solo o in associazione ad altri farmaci antitumorali, ha costituito il cardine della chemioterapia nel cancro pancreatico per quasi vent'anni, prima dell'introduzione della Gemcitabina. Quest' analogo pirimidinico appartiene alla classe degli antimetaboliti ed esercita la sua azione interferendo con la trasformazione dell'acido *desossiuridilico* in *acido timidilico*, privando la cellula di un precursore essenziale della sintesi del DNA. Diminuendo la sintesi del DNA per la carenza di *timidina* si verifica una crescita cellulare sbilanciata e morte cellulare. Il farmaco quindi è particolarmente attivo a livello di cellule in proliferazione. Insieme al 5-FU si somministra anche Leucovorina poiché nella reazione della *timidilato sintetasi* in cui interviene il farmaco è necessario *folato ridotto* come coenzima e la mancanza di sufficiente coenzima riduce l'efficacia dell'antipirimidina. Il 5-FU in quanto tale è inattivo e necessita di essere trasformato nella sua forma attiva (5-FdUMP, *fluorodesossiuridin-monofosfato*); pertanto la perdita della capacità di attivare il pro-farmaco a forma attiva rientra tra le principali forme di resistenza al farmaco, oltre all'aumento della velocità di catabolismo dell'antimetabolita e all'alterazione o all'aumento della *timidilato sintetasi*. Questo chemioterapico viene catabolizzato dal fegato, ma anche a livello di rene e polmone e convertito nella fase finale del suo metabolismo a *fluoro-β-alanina* (eliminata con le urine) e anidride carbonica (eliminata con la respirazione). La via di scelta per la somministrazione del 5-FU è quella endovenosa; il farmaco in questo modo penetra rapidamente nello spazio extracellulare, compreso il liquido cerebrospinale, probabilmente per diffusione semplice. La somministrazione endovenosa del 5-FU può essere effettuata in bolo o mediante infusione continua. La non-linearità della cinetica del 5-FU riflette probabilmente la saturabilità dei processi metabolici o di trasporto alle concentrazioni più elevate del farmaco e costituisce la ragione principale della difficoltà nel predire i livelli plasmatici o la tossicità ad alte dosi. I principali effetti avversi si riscontrano principalmente a livello di organi con cellule in rapida proliferazione, in particolare a livello dell'epitelio gastro-intestinale con nausea, vomito, diarrea e mucositi talvolta ulcerative (stomatiti), e a livello midollare con leucopenia e piastrinopenia. Inoltre si possono verificare reazioni di fotosensibilità cutanea dopo esposizione alla luce solare e diradamento dei capelli. (51)

I pazienti che hanno sviluppato tossicità particolarmente gravi dopo la somministrazione di 5-FU, ed i loro consanguinei hanno presentato un difetto metabolico consistente in un ridotto catabolismo e inattivazione del 5-FU a 5-fluoro-5,6-diidrouracile (5-FDHU). L'enzima che regola tale tappa metabolica è la diidropirimidina deidrogenasi (DPD), un enzima citosolico ubiquitario, presente in molti tessuti tra cui il fegato, la mucosa intestinale ed i leucociti del sangue periferico e il cui deficit

determina gravi forme di tossicità, anche letali, caratterizzate da neutropenia, trombocitopenia, mucosite, diarrea emorragica, alopecia totale e danni neurologici (52).

Capecitabina (CAP)

La capecitabina è un nuovo *carbamato fluoropirimidinico* per uso orale. Dopo il suo assorbimento la Capecitabina che funge da pro-farmaco subisce una serie di reazioni enzimatiche, l'ultima delle quali è un'idrolisi mediata dalla *timidina fosforilasi* (enzima concentrato soprattutto nelle cellule tumorali), che la trasformano in 5-FU. L'attività citotossica della Capecitabina pertanto risulta sovrapponibile a quella del 5-FU. I principali effetti collaterali del farmaco sono iperbilirubinemia, diarrea e una dermatopatia chiamata sindrome mano-piede, caratterizzata da desquamazione eritematosa dei palmi delle mani e dei piedi. Rispetto al 5-FU presenta un minor tasso di stomatiti, alopecia, neutropenia, nausea e diarrea. (53)

Composti del platino: Oxaliplatino (OXA) e Cisplatino (CIS)

Il Cisplatino e l'Oxaliplatino sono due farmaci appartenenti alla categoria degli antineoplastici dei complessi di coordinazione del platino. L'Oxaliplatino è un derivato di terza generazione del platino meno nefrotossico del Cisplatino e non ototossico. Nel trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico vengono impiegati in associazione con Gemcitabina. Il loro meccanismo d'azione è simile a quello dei composti alchilanti, per cui entrando nell'ambiente intracellulare, si legano al DNA formando legami crociati inter- e intra-filamento. Le conseguenti lesioni citotossiche inibiscono la sintesi del DNA e RNA. Inoltre tali composti sono in grado di legare proteine ed altre molecole contenenti gruppi tiolici. Questi farmaci sono citotossici in ogni stadio del ciclo cellulare, ma le cellule sono più vulnerabili alla loro azione nelle fasi G1 ed S. La sensibilità cellulare a CIS e OXA diminuisce se le cellule hanno elevati livelli di *glutathione* o un aumento della riparazione del DNA, oppure se è indotta la *metallotioneina*. Sono somministrati per via endovenosa e la loro principale via di escrezione è quella renale. Tra i principali effetti avversi si annoverano vomito intenso (per cui è utile premedicazione con un antiemetico), nefrotossicità (per cui è necessaria adeguata idratazione dopo somministrazione del farmaco, soprattutto nel caso del Cisplatino), ipomagnesemia e ipocalcemia, ototossicità, debole depressione midollare, tossicità neurologica di tipo sensoriale periferica dose-dipendente (che regredisce alla sospensione del trattamento o in seguito alla riduzione delle dosi) e reazioni di ipersensibilità di gravità variabile. (54,55)

Irinotecan

L'irinotecan è un chemioterapico appartenente alla classe delle campotecine, farmaci estratti dalla corteccia della *Camptotheca acuminata*, che agisce inibendo l'attività della topoisomerasi I, con conseguenti aberrazioni genomiche e innesco dell'apoptosi. Esso è un profarmaco attivato a livello epatico grazie alla trasformazione operata dall'enzima carbossiesterasi (CES1 e CES2) in SN-38, che viene poi inattivato da un processo di glucuronazione, mediata da membri della famiglia dell'UDP-glucuronosiltransferasi, ed eliminato attraverso la bile. CYP3A4, invece, converte l'irinotecan nel suo metabolita inattivo, APC, per cui l'utilizzo di farmaci induttori di CYP450 determinerà una riduzione dell'attività del farmaco. I principali effetti avversi sono rappresentati da mielodepressione, febbre, crampi addominali, nausea, vomito e diarrea che può essere un evento precoce (entro 24h, collegata all'attivazione colinergica e trattabile con atropina) o tardivo (a 3-10 giorni dalla somministrazione, anche molto grave, con possibile comparsa di squilibri idro-elettrolitici). Clinicamente rilevante è l'associazione tra ridotti livelli di UDP-glucuronosiltransferasi (UGT1A1), determinati da polimorfismi del gene UGT1A1, in particolare UGT1A1*28, ed effetti tossici del farmaco (56). L'irinotecan, in associazione con fluorouracile, leucovorina e oxaliplatino (FOLFIRINOX) è indicato nel trattamento dell'adenocarcinoma duttale pancreatico avanzato.

Nab-Paclitaxel

Il paclitaxel (taxolo), scoperto nel 1967 da Monroe Wall e Mansukh Wani, che lo isolarono dalla corteccia del tasso del Pacifico (*Taxus brevifolia*) è un agente chemioterapico appartenente al gruppo dei taxani, in grado di inibire la mitosi.

Il suo meccanismo d'azione è legato alla capacità di interagire con i microtubuli, alterandone l'equilibrio dipolimerizzazione/depolimerizzazione. Ciò provoca la formazione di strutture microtubulari altamente stabili, con conseguente inibizione della mitosi della cellula, che richiede la dissoluzione dei microtubuli per la successiva formazione del fuso mitotico.

Nella formulazione Nab-paclitaxel, che sfruttando le nanotecnologie permette di migliorare l'azione selettiva della chemioterapia e la capacità di raggiungere la sede del tumore, il chemioterapico è legato all'albumina in nanoparticelle di dimensioni medie di 130 nanometri. L'albumina potenzia il trasporto attivo di paclitaxel attraverso le cellule endoteliali e facilita il suo accumulo nelle cellule tumorali, per un meccanismo attivo di transitosi, in quanto va a legarsi al recettore gp60 sulla parete dei vasi sanguigni, cosicché il complesso albumina-farmaco può attraversare facilmente le pareti dei vasi per raggiungere la sede della neoplasia. Infatti il legame dell'albumina con il suo

recettore, attiva caveolina-1, che risulta nell'invaginazione delle cellule della parete endoteliale, andando a formare strutture vescicolari chiamate caveole che intrappolano i costituenti plasmatici. In questo modo è possibile ottenere concentrazioni di paclitaxel libero nell'organismo dieci volte superiori a quelle rilasciate dalla formulazione tradizionale del farmaco e di raggiunge concentrazioni superiori del 33% all'interno delle cellule tumorali. Ciò si rivela particolarmente importante nel caso del cancro pancreatico che risulta caratterizzato da una componente stromale densa e poco vascolarizzata che circonda le cellule tumorali, costituendo una barriera pressochè impenetrabile ai chemioterapici. Nab-paclitaxel può penetrare nello stroma demolendo di conseguenza questa robusta barriera, permettendo alla chemioterapia e a eventuali altri farmaci somministrati in concomitanza di raggiungere le cellule tumorali. SPARC (secreted protein acid and rich in cysteine), è una glicoproteina di 32 KDa appartenente ad un gruppo di componenti della matrice extracellulare che mediano le interazioni cellula-matrice, svolgendo un ruolo chiave in multiple funzioni cellulari, tra cui invasione cellulare, proliferazione e angiogenesi. Sebbene l'espressione di SPARC sia ridotta nelle cellule dell'adenocarcinoma duttale pancreatico a causa dell'ipermetilazione del promotore, lo stroma circostante frequentemente dimostra espressione di SPARC nei fibroblasti peritumorali. SPARC lega l'albumina con elevata affinità e ciò consente un incremento dell'uptake di nab-paclitaxel nello spazio interstiziale, con conseguente aumento della concentrazione intratumorale del farmaco. (57,58) **(Fig 6)**

I risultati dello studio internazionale di fase III condotto da Von Hoff e colleghi hanno validato l'introduzione dello schema nab-paclitaxel più gemcitabina, per il trattamento di prima linea dell'adenocarcinoma duttale pancreatico metastatico. La modalità di somministrazione prevede l'infusione per via endovenosa di nab-paclitaxel nell'arco di 30minuti, alla dose di 125mg/m², seguita dalla somministrazione endovenosa di gemcitabina nell'arco di 30minuti alla dose di 1000 mg/m² nei giorni 1,8, 15 di ciascun ciclo di 28 giorni. I più comuni effetti avversi osservati sono stati mielotossicità con neutropenia, affaticamento e neuropatia. La neuropatia si è dimostrata rapidamente reversibile e il 44% dei pazienti è stato in grado di riprendere il trattamento.

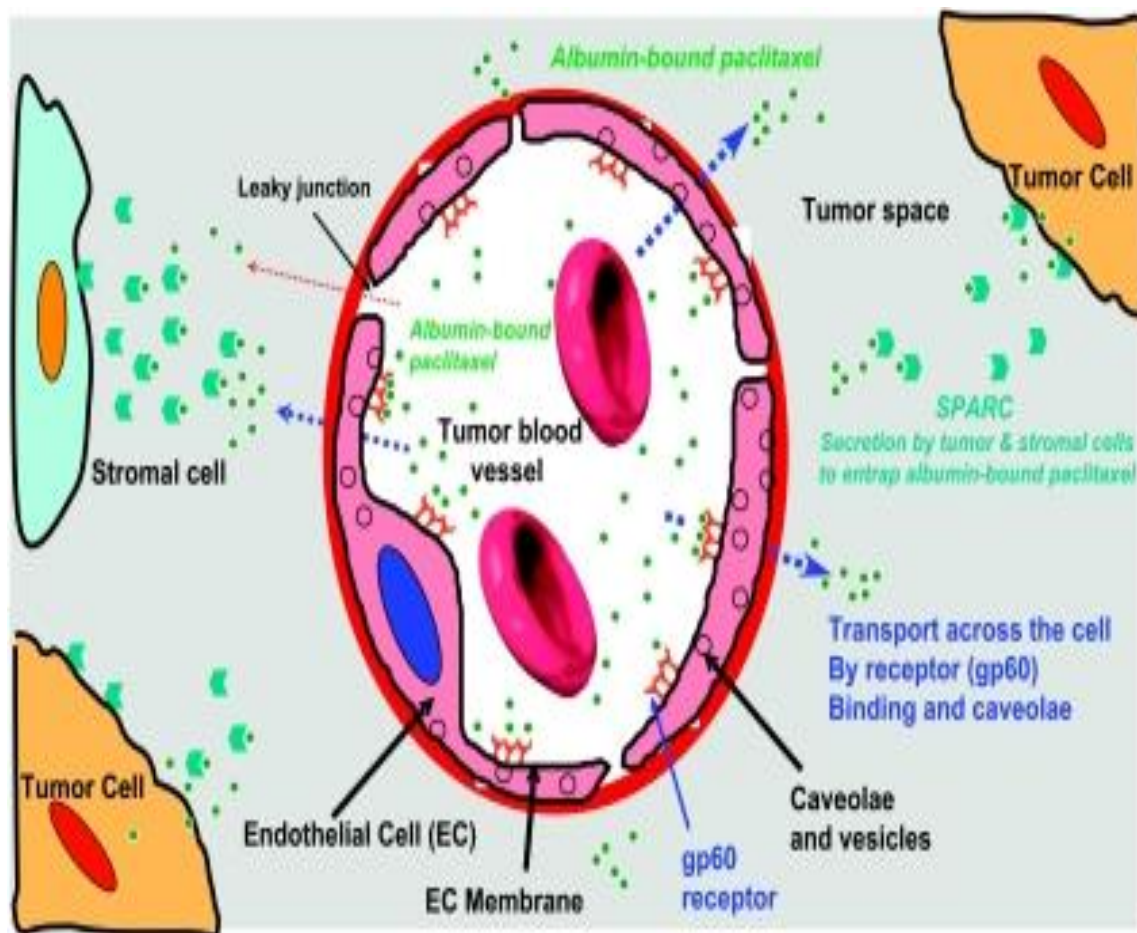


Fig.6 Meccanismo di trasporto e accumulo di nab-paclitaxel nei tumori.

2.4 TARGET THERAPIES

Attualmente è disponibile una nuova categoria di molecole antitumorali in grado di colpire specifici bersagli, di natura essenzialmente proteica, con un ruolo critico nella crescita e nella progressione tumorale. Ciò consente di effettuare un tipo di terapia “mirata”, riducendo notevolmente la tossicità rispetto ai trattamenti tradizionali. Attualmente nonostante i numerosi studi in materia, risultano scarse le applicazioni in ambito clinico e l’analisi della biologia del tumore grazie alle nuove tecniche di NGS potrebbe rilevarsi fondamentale in questo ambito terapeutico.

Inibitori dell’ EGFR

A livello del carcinoma pancreatico è stato a lungo studiato il possibile ruolo terapeutico di molecole in grado di interferire con la cascata di segnale mediata dal recettore tirosin-chinasico

dell'EGF, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Questa proteina è attivata da una serie di segnali tra cui EGF, TGF α , HB-EGF ed altre molecole appartenenti alla famiglia delle reguline. In seguito al legame recettore-ligando si attiva una cascata trasduzionale che interferisce con varie vie di segnale tra cui via di Ras/MAP kinasi, via di PI3K/Akt, via di JAK/STAT, via della fosfolipasi C/proteina chinasi C, che hanno come obiettivo finale la regolazione della trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione, adesione, migrazione, differenziazione cellulare e apoptosi. Nell'adenocarcinoma duttale pancreatico EGFR e alcuni suoi ligandi sono frequentemente iperespressi e ciò sembra essere correlato con una maggiore aggressività tumorale e cattiva prognosi. (59)

Pertanto sono stati effettuati studi sul possibile ruolo terapeutico di anticorpi monoclonali diretti contro il dominio extracellulare del recettore EGFR.

- *Erlotinib*: è un anticorpo monoclonale che inibisce l'attività del dominio tirosin-chinasico dell'EGFR in maniera reversibile e competitiva. Studi preliminari sull'utilizzo dell'Erlotinib da solo o in combinazione con GEM hanno mostrato un'interessante attività antitumorale e buona tollerabilità. In seguito è stato condotto uno studio di fase III in doppio cieco con arruolamento di 569 pazienti con malattia localmente avanzata o metastatica, ai quali veniva somministrato in parte GEM+placebo e in parte GEM+Erlotinib. L' OS nel gruppo dei soggetti in trattamento sperimentale era di 6.24 mesi, mentre in quello con GEM+placebo di 5.91 mesi, con una sopravvivenza ad un anno del 23% nei primi e del 17% nei secondi. A livello degli effetti avversi il gruppo dell'Erlotinib ha sviluppato una maggior incidenza di rash cutaneo di grado 3 e 4 e diarrea (6% vs 1%). Il rash è stato osservato più frequentemente nei pazienti giovani e con il miglior *performance status*. Lo sviluppo di questa complicanza è stato associato all'incremento della sopravvivenza ($p=0.037$). (92). Erlotinib è stato valutato anche in combinazione con GEM nei pazienti refrattari alla terapia in uno studio di fase II con una sopravvivenza globale di 6.5 mesi e un 10% di risposta parziale. Questa combinazione potrebbe essere valutata come seconda linea di trattamento in pazienti che hanno ricevuto un regime chemioterapico contenente GEM come prima linea di terapia.
- *Cetuximab*: è un anticorpo monoclonale, costituito da un IgG1 chimerica, con un'elevata affinità di legame per il dominio extracellulare del recettore EGFR. La sua azione limita la via Ras/PI3K nella trasduzione cellulare di EGFR e induce la degradazione del complesso del recettore. Inoltre favorisce la sintesi di proteine pro-apoptotiche, riduce la formazione di VEGFR ed è in grado di aumentare l'efficacia della chemio-radioterapia, riducendo la capacità di riparazione del DNA. In seguito a interessanti risultati emersi da uno studio di fase I, uno studio di fase II ha valutato

l'efficacia e la tollerabilità del Cetuximab associato a GEM in pazienti metastatici o con malattia localmente avanzata con espressione patologica di EGFR, rispetto a GEM in monoterapia. Il trattamento è stato generalmente ben tollerato e lo sviluppo di rash cutaneo soprattutto di grado 3 e 4 è stato associato a un incremento della sopravvivenza; la sopravvivenza media e il PFS erano superiori rispetto alla norma, rispettivamente di 7.1 mesi e 3.8 mesi. (60). Tuttavia nonostante questi risultati incoraggianti, lo studio di fase III condotto da Philip e colleghi ha fallito nel confermare un vantaggio clinico significativo ottenuto dall'associazione di Cetuximab e GEM confrontato con GEM in monoterapia, sia in termini di OS che di PFS nell'adenocarcinoma pancreatico avanzato. Infatti la mediana di sopravvivenza nei pazienti trattati con l'associazione è stata di 6.3 mesi rispetto ai 5.9 in monoterapia ($p=0.14$). (61)

- *Geftinib*: è un inibitore delle tirosin-chinasi con meccanismo competitivo simile a Erlotinib. Questa molecola è stata valutata in associazione con GEM rispetto alla monoterapia in uno studio di fase II con arruolamento di 53 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico inoperabili o metastatici. La mediana di sopravvivenza e la PFS sono state rispettivamente di 7.3 e 4.1 mesi e la sopravvivenza a un anno è stata del 27% con una risposta parziale del 9% e una stabilità di malattia del 23%. (62). Tuttavia l'efficacia di questa molecola non è confermata.

Sono state valutate anche altre molecole come *Lapatinib* e *Trastuzumab* ma un loro impiego nel trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico non ha mostrato vantaggi clinicamente rilevanti (63,64).

Inibitori della neoangiogenesi

La crescita tumorale e la metastatizzazione della neoplasia dipendono in larga misura dalla neoangiogenesi. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) è il più importante mediatore della neoangiogenesi tumorale conosciuto, che esplica la sua funzione mediante il legame con due recettori VEGFR-1 e VEGFR-2. L'overespressione di VEGF si riscontra anche nel tumore pancreatico ed è correlata, nello specifico, con progressione di malattia.

- *Bevacizumab*: è un anticorpo monoclonale umanizzato ricombinante anti-VEGFR. È stato valutato in uno studio di fase II in combinazione con chemioterapia tradizionale con risultati incoraggianti (65), che hanno posto le basi per un successivo studio di fase III condotto da Kindler e colleghi. In questo trial è stata valutata l'associazione di Bevacizumab e GEM ed è emersa una risposta parziale nel 21% dei casi e una stabilità di malattia nel 48%, con un TTP e un'OS rispettivamente di 5.4 e 8.8 mesi. Tuttavia il successivo studio di fase III CALGB 80303

dallo stesso disegno del precedente ha invece dimostrato che l'associazione di Bevacizumab e GEM non provoca miglioramento della sopravvivenza globale rispetto alla GEM in monoterapia (TTP 4.8 vs 4.3 mesi; OS 5.2 vs 5.8 mesi). (66)

- *Sorafenib*: è una molecola in grado di inibire la crescita tumorale agendo sulla via delle MAPK ed è stata valutata da sola o in associazione con chemioterapia in diverse tipologie di cancro. Tuttavia gli studi condotti per testare la sua efficacia in associazione a GEM nell'adenocarcinoma pancreatico sono dimostrati fallimentari. (67)

Composti anti-IGFR

IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) porta all'attivazione del pathway PI3K-AKT attraverso il legame al suo recettore IGF-1R, stimolando la segnalazione antiapoptotica sulle cellule maligne. Nell'adenocarcinoma duttale IGF-1 e il suo recettore risultano costitutivamente iperespressi. Pertanto recentemente sono stati valutati in studi di fase II schemi terapeutici con associazione tra Gemcitabina e *composti anti-IGFR* (AMG 479, Conatumumab) con risultati incoraggianti. (68)

Inibitori delle Metalloproteinasi

Il processo di invasione e metastatizzazione richiede la penetrazione dei tessuti circostanti e dei vasi sanguigni linfatici. In questo fenomeno gli enzimi chiamati metalloproteinasi, deputati alla degradazione della matrice extracellulare svolgono un ruolo centrale. (69) L'attività delle quattro classi di metalloproteinasi (collagenasi, gelatinasi, stromalisine, e metalloelastasi) è controbilanciata da inibitori locali. Gli inibitori farmacologici delle metalloproteinasi, come il *Marimastat* non hanno un effetto citotossico diretto, per cui non possono essere valutati in termini di risposta obiettiva, ma soltanto mediante i parametri di sopravvivenza. Gli interessanti risultati ottenuti dagli studi condotti su modelli animali, non hanno purtroppo trovato riscontro in ambito clinico. In particolare il *Marimastat* è stato valutato in uno studio randomizzato di fase III condotto su 414 pazienti con cancro del pancreas localmente avanzato: il tasso di sopravvivenza dei soggetti trattati con *Marimastat* è risultato simile a quello di coloro trattati con gemcitabina in monoterapia (70). Un successivo studio di fase III non ha però dimostrato alcun significativo miglioramento in termini di beneficio clinico del *Marimastat* sulla sola gemcitabina. (71)

Inibitori della farnesil-transferasi

La proteina ras, prodotto dell'oncogene ras, che è frequentemente mutato nel cancro pancreatico, deve essere farnesilata per potersi localizzare nella membrana cellulare ed essere attivata. Una volta

attivata la proteina ras, come altre proteine transmembranarie, traduce uno stimolo esterno in un segnale di divisione cellulare e quindi di proliferazione. *Tipifarnib* è un inibitore della farnesil-transferasi che ha dimostrato effetti anti-proliferativi in un'ampia gamma di linee cellulari tumorali, tra cui quelle di origine pancreatica. (72) L'impatto clinico del *Tipifarnib* è stato un fallimento e non ha dimostrato miglioramenti dell'OS rispetto alla gemcitabina in monoterapia, né come agente singolo, né combinato con gemcitabina. (73)

Nella genesi tumorale vi sono numerose vie biochimiche alterate, pertanto esiste un forte razionale per l'associazione di Erlotinib ed altri agenti biologici con meccanismo d'azione differente, realizzando la "politarget therapy". Attualmente sono in corso numerosi studi clinici e preclinici per valutare l'associazione di diverse classi di nuovi farmaci biologici in combinazione con la Gemcitabina.(4) Tra gli studi che hanno valutato tale associazione ricordiamo lo studio AVITA, un trial randomizzato, multicentrico di fase III che ha considerato la sicurezza e l'efficacia di associazione di bevacizumab a erlotinib e gemcitabina in pazienti con cancro pancreatico metastatico. La triplice associazione non ha permesso di raggiungere l'end-point primario dello studio, in quanto non si è avuto un significativo benefit nell'ambito dell'OS. Si è comunque ottenuto una differenza numerica in termini di tempo di sopravvivenza tra i due bracci gemcitabina-erlotinib-bevacizumab e gemcitabina-erlotinib (7,1 vs 6,0 mesi), con un HR di 0,89 che riflette un 11% di riduzione del rischio di morte (P= non significativa). Questo risultato potrebbe essere risultato da un limitato ma significativo guadagno in termini di PFS (HR di 0,73; 1 mese di guadagno nel braccio bevacizumab), suggerendo che un sottogruppo di pazienti potrebbe avere un vantaggio dalla combinazione con bevacizumab. Non è stato però possibile definire le caratteristiche di quei pazienti che potrebbero beneficiare di tale combinazione terapeutica. (74)

3. APPROCCI MOLECOLARI IN ONCOLOGIA CLINICA

Sotto il profilo patogenetico è ormai noto come il cancro sia il risultato del sommarsi di molteplici alterazioni genomiche in grado di interferire con meccanismi di controllo del ciclo cellulare, di differenziazione cellulare, con i meccanismi di riparazione del DNA, con apoptosi e neoangiogenesi. Questo si traduce in una proliferazione incontrollata dei cloni cellulari interessati e nell'accumulo di ulteriori mutazioni. Al substrato genetico ereditario di ogni individuo si sommano mutazioni somatiche che possono coinvolgere molecole di DNA, RNA o proteine cellulari, generando la neoplasia. I meccanismi di alterazione sono diversi e sono particolarmente pericolosi quando interessano oncosoppressori e oncogeni: i primi sono soggetti a perdita di funzione (*loss of function*) dovuta a mutazioni puntiformi o delezioni, mentre i secondi vengono attivati (*gain of function*) in maniera incontrollata mediante mutazioni, inserzioni, delezioni *in frame*, amplificazioni, anche se il meccanismo di attivazione più comune di un oncogene dominante rimane il riarrangiamento genomico (o traslocazione), che genera proteine di fusione o trasloca il gene sotto il controllo di elementi regolatori impropri che determinano la sua espressione aberrante e incontrollata. Alla base del cancro, dunque, vi è un'instabilità genomica dovuta all'accumulo di mutazioni, che possono essere: SNV; inserzioni e delezioni; CNV e traslocazioni. Contribuiscono all'instabilità genomica anche le anomalie cromosomiche, termine con il quale si intendono più in generale le traslocazioni inter- e intracromosomiche e le fusioni fra cromosomi che possono comportare la perdita di geni la cui funzione è essenziale nella regolazione del ciclo cellulare. Lo spettro di queste alterazioni è, dunque, molto vario, e frequentemente le mutazioni funzionali (*driver*) fondamentali per l'iniziazione, la progressione e la stabilità della neoplasia, sono accompagnate da molteplici mutazioni intercorrenti (*passenger*) che dipendono dall'instabilità genomica o semplicemente dal numero di divisioni cellulari che conducono da una singola cellula trasformata ad una massa clinicamente diagnosticabile. Attualmente la comprensione dei cambiamenti molecolari coinvolti nel processo di carcinogenesi e nella progressione tumorale rappresenta uno dei più importanti campi di ricerca in oncologia medica. Il completamento del sequenziamento del genoma umano e lo sviluppo di tecnologie sempre più all'avanguardia sia di proteomica che di genomica hanno aperto nuovi scenari nella ricerca sulla biologia molecolare dei tumori grazie alla possibilità di analizzare le alterazioni a carico di DNA, RNA e i livelli di espressione proteica implicate nel processo carcinogenetico. (75) Un'approfondita conoscenza della biologia del tumore primitivo e delle localizzazioni secondarie può aprire la strada all'

identificazione di marcatori biologici che possano ricoprire un ruolo prognostico, integrando una classificazione molecolare ai parametri di stadiazione classica. Oltre a marcatori prognostici possono essere identificati anche marcatori molecolari predittivi di risposta alla terapia, che consentono l'individualizzazione del trattamento secondo un concetto ormai largamente condiviso dalla comunità scientifica di terapia "cucita addosso al paziente" (tailored-therapy). Inoltre comprendere la biologia molecolare che accompagna la progressione tumorale può portare all'identificazione di nuovi target molecolari per lo sviluppo di innovative opzioni terapeutiche.

(76)

3.1 Tecnologia Microarray e applicazioni in oncologia medica

Il razionale dell'impiego della biologia molecolare nella patologia neoplastica risiede nel determinare come specifiche alterazioni genetiche, genomiche ed epigenetiche nei tumori possono influenzare la prognosi e portare a terapie mirate per il singolo malato.

A partire dagli anni '90 (Fodor e colleghi, 1991) lo sviluppo della tecnologia microarray ha completamente rivoluzionato il panorama delle metodiche di analisi molecolare, precedentemente costituito da FISH, PCR e Southern Blot, consentendo di passare dall'analisi di un singolo gene alla valutazione di migliaia di geni durante un singolo esperimento e aprendo le porte alla nascita della genomica. Il termine "microarray" identifica un insieme di sonde (probe), costituite da oligonucleotidi di DNA che rappresentano una specifica regione del genoma umano o uno specifico trascritto, ordinate e fissate ad un supporto solido (matrice), formato da diversi tipi di materiale (silicio, vetro o plastica). Il concetto cardine su cui si basa questa tecnologia è l'ibridazione inversa, ovvero la complementarità tra un probe e un filamento di DNA o cDNA (ottenuto dalla trascrizione inversa di mRNA isolato dal campione), marcati con un fluoroforo. I microarray costituiscono una versione ad alta densità dei saggi di Southern Blot, tecnologia che fa anch'essa ricorso all'utilizzo di sonde di DNA complementari alla sequenza di interesse, in cui le probe vengono immobilizzate ad una distanza di pochi micrometri l'uno dall'altro su una superficie solida di pochi cm², anziché essere distribuiti sulla membrana contenente campioni di DNA o RNA. Oltre all'elevata densità delle probe fissate sulla matrice, un'altra importante innovazione è costituita dal modo ordinato e rigoroso con cui è disposto il materiale sul supporto. Pertanto i dati ricavati possono essere fatti risalire a ciascun campione analizzato, ottenendo un'analisi estremamente mirata e selettiva. L'acido nucleico di partenza viene marcato con un gruppo fluorescente visualizzabile con un fascio laser capace di eccitare il fluorocromo, consentendo di effettuare una

stima quantitativa del campione sulla base della valutazione della quota di emissione fluorescente che rappresenta l'intensità di ibridazione. L'analisi ottenuta non è da considerarsi assoluta, ma è sempre effettuata sulla base del confronto con un campione di riferimento. La tecnologia microarray trova numerosi campi di applicazione nel settore dell'analisi molecolare, in particolare viene impiegata nel determinare il profilo di espressione genica e il profilo genomico cellulare. (77)

Il profilo di espressione genica (*Gene Expression Profiling*) consente di valutare simultaneamente l'espressione di migliaia di geni attivati in una cellula, elaborando uno specifico ritratto molecolare della cellula analizzata. Mediante il confronto tra cellule neoplastiche e cellule normali di uno stesso tessuto, è possibile valutare le differenze in termine di espressione genica (geni up e down regolati) e le più comuni varianti di splicing. Le piattaforme microarray impiegate nell'analisi di *Gene Expression Profiling* sono commercializzate da varie aziende produttrici tra cui Affymetrix, Illumina, Agilent, Applied Biosystem. (78)

Il profilo genomico invece corrisponde ad un'analisi cariotipica ad altissima risoluzione, permettendo l'identificazione di anomalie cromosomiche numeriche e strutturali (amplificazioni, delezioni), Loss of Heterozygosity (LOH), Uniparental Disomy (UPD) e genotipizzazione. La tecnologia microarray impiegata in questo caso è costituita da CGH array e SNP Array, prodotta dalle medesime aziende produttrici precedentemente elencate. (79)

Il metodo più comunemente utilizzato per caratterizzare le aberrazioni cromosomiche nell'ultimo decennio è stato l'ibridazione genomica comparativa (CGH array). In questa metodica vengono utilizzati microarray in cui sono fissati probe per rilevare le differenze tra il numero di copie di determinate sequenze genomiche del tessuto campione rispetto a quello di un corrispettivo sano dello stesso tessuto. La differenza viene rilevata attraverso la marcatura con due colori differenti dei due DNA. Tuttavia questo tipo di approccio presenta una bassa risoluzione, in quanto lesioni genomiche inferiori a 5-10 Mb non sono rilevabili.

La risoluzione offerta dalla tecnologia SNP Array risulta invece molto più elevata. I Single nucleotide polymorphisms (SNP) rappresentano variazioni della sequenza del DNA di un singolo nucleotide e sono la più comune forma di variazione genetica nel genoma umano con media di 1 SNP ogni 400-1000 bp. Esistono circa 10 milioni di SNP in tutte le sottopopolazioni umane, di cui 6 milioni sono già stati identificati. La loro elevata densità nel genoma umano li rende ottimi marcatori per valutare il profilo genomico di una cellula in modo rapido e preciso ed è proprio questa proprietà alla base della tecnologia SNP Array. Infatti in questo caso le probe sono costituite da sonde oligonucleotidiche progettate per rilevare i due alleli di un dato locus di SNP. Pertanto l'intensità di segnale, che è direttamente proporzionale all'entità dell'ibridazione fra frammenti del

DNA campione e probe, consentirà di valutare se è presente una variazione in termini di numero di copie della sequenza d'interesse. (80)

La tecnologia SNP Array rappresentata dalla piattaforma Genome-Wide Human SNP Array 6.0 di Affymetrix contiene più di 906,000 SNP e più di 946,000 probe per la rilevazione CNV (Copy Number Variant) e sarà la metodica utilizzata nel nostro studio, descritta in dettaglio nella parte dei metodi. (81)

Gli attuali metodi di determinazione dei profili di espressione genica hanno permesso di rivelare come tipi di tumore ritenuti omogenei in base a criteri istologici, hanno invece spesso diverse firme molecolari sottostanti. Nell'ambito dei tumori solidi questo concetto è stato applicato per primo alla neoplasia mammaria, che appare oggi come il tumore meglio caratterizzato geneticamente e un modello di studio dell'espressione genica per tutti i tumori solidi. Infatti gli studi condotti da Perou e colleghi hanno mostrato come siano presenti sottotipi molecolari distinti di cancro mammario, anche con caratteristiche istopatologiche identiche, cambiando radicalmente il panorama di ricerca sul tumore della mammella. (82)

Il profilo di espressione di specifici geni che contribuiscono all'induzione, alla progressione, al grado di aggressività del tumore e infine anche al risultato della terapia, appare fortemente influenzato da complessi eventi mutazionali. Pertanto metodi genomici che identificano aberrazioni cromosomiche con una risoluzione elevata quanto il *Gene Expression Profiling*, possono rappresentare un valido strumento per identificare i geni realmente rilevanti tra la molteplicità delle differenze registrata nel profilo di espressione genica. Allo stesso modo la tecnica di analisi SNP Array consente un'approfondita analisi strutturale del genoma delle cellule tumorali esaminate. (83)

Il recente studio sulla leucemia infantile linfoblastica acuta (ALL) condotto da Mullighan e colleghi è un ottimo esempio delle numerose applicazioni di questa metodica. In questo studio clinico gli autori hanno analizzato 192 casi pediatrici di leucemia acuta linfoblastica a cellule B (ALL-B), di cui il 94% era associato ad un campione di controllo ricavato alla remissione della malattia. L'analisi di copy-number di Mullighan ha rilevato la prevalenza di delezioni cromosomiche in tutti i sottogruppi, tranne nei casi iperdiploidi (casi con più di 50 cromosomi nel clone leucemico), in cui dominavano le amplificazioni. La massima frequenza di delezioni è stata trovata nei casi ipodiploidi (con meno di 45 cromosomi nel clone leucemico), e nei casi in cui il gene ETV6 (sul cromosoma 12) e il gene RUNX1 (sul cromosoma 21), entrambi codificanti fattori di trascrizione, risultavano fusi mediante una traslocazione cromosomica. Complessivamente, lo studio ha identificato più di 40 regioni, ripetutamente delete in diversi pazienti, con tre segmenti focali del cromosoma 9 che mostrano la più alta frequenza complessiva di delezioni. In particolare un terzo di

tutti i pazienti presentavano delezioni nel locus genico di CDKN2A (9p21.3), codificante l'oncosoppressore p16. In alcuni casi era particolarmente ricorrente la delezione del gene PAX5, localizzato nella banda cromosomica 9p13.2. In base a studi funzionali, gli autori hanno identificato la perdita di questo gene come evento appartenente alle fasi iniziali del processo di carcinogenesi, poiché esso codifica un fattore di trascrizione che guida la differenziazione di cellule progenitrici B e reprime programmi di automantenimento. L'aploinsufficienza era predominante rispetto alla perdita omozigote di PAX5, accompagnata da mutazioni dell'allele rimanente solo in una minoranza dei casi. Anche il gene EBF1, codificante un altro fattore di trascrizione importante nella differenziazione delle cellule B progenitrici, è risultato deletato in diversi casi e in particolare sei casi hanno mostrato delezioni focali interessanti solo il locus EBF1 (pertanto non rilevabili mediante analisi citogenetica convenzionale). L'identificazione dei geni PAX5 e EBF1 come nuovi bersagli mutazionali nelle fasi iniziali della leucemogenesi in questo lavoro, rende ragione del valore degli studi mediante SNP Array per l'identificazione di nuovi marcatori molecolari. (84)

Anche nello studio di Sellers e colleghi sul melanoma, alterazioni di copy-number identificate mediante tecnologia SNP Array sono state sfruttate per scoprire nuove vie di segnalazione alterate. Gli autori hanno valutato nove linee cellulari, individuando diversi cluster in base alla condivisione di amplificazioni e delezioni di determinate regioni. Un cluster, composto da sei delle nove linee cellulari, ha mostrato un'amplificazione significativa a livello del cromosoma 3p. Impiegando l'analisi del profilo di espressione genica, è stato identificato un piccolo insieme di geni altamente espressi, tra cui il gene che codifica il fattore di trascrizione MITF, localizzato in una regione di cromosoma 3p. Ulteriori studi hanno stabilito che MITF favorisce la sopravvivenza cellulare, presentando quindi un ruolo oncogenico nel melanoma. Inoltre l'amplificazione di MITF era più diffusa nella malattia metastatica e correlava con una diminuzione della sopravvivenza globale. Questa acquisizione ha presentato anche risvolti terapeutici, in quanto una riduzione dell'attività di MITF appariva sensibilizzare le cellule di melanoma agli agenti chemioterapici. Pertanto vi è un razionale all'impiego di MITF come target terapeutico. (85)

Questi lavori sono validi esempi delle notevoli potenzialità applicative della tecnologia SNP Array in oncologia, consentendo l'individuazione di regioni con modificazioni strutturali del genoma tumorale da indagare più approfonditamente e contribuendo quindi alla scoperta di nuovi oncogeni e oncosoppressori coinvolti nel processo di carcinogenesi. In ambito clinico questo può portare all'identificazione di nuove sottoclassificazioni dei tumori in base alle anomalie genomiche da affiancare ai parametri istologici, all'identificazione di parametri prognostici e di risposta alla

terapia e infine alla scoperta di nuovi target terapeutici, per assegnare ad ogni paziente la terapia più appropriata. (83)

Questo rappresenta pertanto il razionale con cui è stata applicata questa tecnologia anche allo studio della biologia del tumore pancreatico.

3.2 Tecniche di Sequenziamento Massivo in oncologia medica

La consapevolezza che decodificare il genoma umano avrebbe fornito informazioni chiave riguardanti il profilo genetico di patologie tumorali e non, e per lo sviluppo di strategie di prevenzione, diagnosi e terapia, ha dato impulso nelle decadi passate a importanti sforzi per la messa a punto di strategie innovative per la caratterizzazione del genoma come il sequenziamento Sanger

(o capillary based-sequencing) e la tecnologia Microarray che hanno consentito di effettuare l'analisi di mutazioni, amplificazioni e delezioni. The Human Genome Project (HGP), completato nel 2004, ha permesso di decodificare la sequenza di ognuno dei cromosomi umani, fornendo un genoma di riferimento rispetto a cui comparare genomi umani alternativi e ha posto ulteriormente in evidenza la crescente necessità di tecnologie in grado di determinare in modo rapido, poco costoso e accurato la sequenza genomica. (86)

Fino a pochi anni fa il metodo utilizzato per il sequenziamento genomico era essenzialmente costituito dal *Sanger sequencing*, definito anche *first generation sequencing*, basato sull'utilizzo di dideossinucleotidi trifosfati marcati (con radioattivi o fluorocromi) come terminatori della catena di sintesi del DNA in posizioni specifiche. I nucleotidi dideossitriphosphate sono molecole artificiali corrispondenti ai nucleotidi naturali, da cui si differenziano per l'assenza del gruppo idrossilico sul carbonio 2' e 3' della molecola e in virtù della loro conformazione, impediscono che un altro nucleotide si leghi ad essi, non potendosi formare legami fosfodiesterici. Il protocollo classico richiede un template di DNA a singolo filamento, un primer per iniziare la reazione di polimerizzazione, una DNA polimerasi, deossinucleotidi e dideossinucleotidi per terminare la reazione di polimerizzazione. Il campione di DNA da sequenziare viene diviso in quattro reazioni separate, ognuna delle quali contiene la DNA polimerasi e tutti i 4 deossiribonucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ad ognuna di queste reazioni viene poi aggiunto solo uno dei quattro nucleotidi dideossi (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) in quantità stechiometricamente inferiore per permettere una elongazione del filamento sufficiente per l'analisi. L'incorporazione di un dideossinucleotide lungo il filamento di DNA in estensione ne causa la terminazione prima del

raggiungimento della fine della sequenza di DNA stampo; questo dà origine ad una serie di frammenti di DNA di lunghezza diversa interrotti in corrispondenza dell'incorporazione del dideossinucleotide, che avviene casualmente quando esso è utilizzato dalla polimerasi in luogo di un nucleotide deossi. I frammenti generati da queste reazioni vengono poi fatti correre su gel di poliacrilamide-urea che permette la separazione dei vari frammenti con una risoluzione di un nucleotide. Ognuna delle 4 reazioni è corsa su pozzetti vicini, dopodiché le bande sono visualizzate su lastra autoradiografica sotto luce UV, e la sequenza viene letta direttamente sulla lastra o sul gel, a seconda del tipo di marcatura dei nucleotidi dideossi (87). Basandosi su questa procedura, la metodica è stata affinata per facilitare la reazione, e con l'avvento dell'automatismo la reazione di sequenziamento è diventata molto più veloce. Attualmente è possibile effettuare, anziché quattro reazioni distinte per ogni nucleotide modificato, una sola reazione utilizzando i 4 ddNTPs marcati fluorescentemente in modo diverso tra loro ed utilizzando lettori ottici appropriati. In questo modo ogni filamento di DNA emetterà una luce di colore diverso in base al nucleotide (ddNTP) col quale termina. Il metodo Sanger risulta avere notevoli svantaggi soprattutto per il basso numero di campioni analizzabile in parallelo. Il sequenziamento Sanger, infatti, viene eseguito su singoli ampliconi e ha una sensibilità limitata se nel campione è presente una minor popolazione di cellule tumorali.

Proprio per far fronte a questo limite, a partire dal 2005 sono state sviluppate una serie di nuove tecnologie per il sequenziamento massivo del DNA, definite nel complesso Next Generation Sequencing (NGS) o second-generation sequencing o sequenziamento massivo parallelo, in grado di produrre, in breve tempo, un quantitativo elevatissimo di dati ad un costo notevolmente inferiore per mezzo di un elevato numero di letture in parallelo. Il NGS consente, quindi, di effettuare uno studio *in toto* dei genomi ad elevata risoluzione, fornendo un quadro completo di una serie di varianti somatiche e germinali come sostituzioni nucleotidiche, inserzioni-delezioni, varianti di numero di copie e riarrangiamenti genomici. La tecnologia NGS può essere applicata ai campioni tumorali con varie modalità: il materiale di partenza dell'analisi molecolare può essere DNA, RNA, cromatina; la proporzione del genoma d'interesse è variabile: dall'intero genoma, all'esoma, al trascrittoma; il tipo di alterazione studiata può essere un cambiamento strutturale, una mutazione puntiforme, l'espressione di un gene. Inoltre elemento chiave del NGS è l'*oversampling*, cioè la lettura della stessa sequenza un elevato numero di volte, in modo da ottenere una buona sicurezza di lettura e informazioni molto accurate. (88)

In campo oncologico, i primi risultati risalgono al 2008, con il sequenziamento completo del genoma di una leucemia mieloide acuta (LMA) a cariotipo normale, comparato con il DNA

proveniente dalla cute normale dello stesso paziente, che ha portato all'identificazione di dieci nuove mutazioni somatiche acquisite dalla cellula leucemica. (89)

Nello stesso anno, in uno studio condotto da Campbell e altri sono stati identificati 103 riarrangiamenti inter- e intracromosomici mediante sequenziamento massivo di due linee cellulari di carcinoma del polmone, una di un carcinoma a piccole cellule e una di un tumore neuroendocrino polmonare. (90)

È importante notare che prima del whole genome sequencing non erano disponibili metodiche di studio dei riarrangiamenti cromosomici per i cariotipi complessi dei tumori solidi, così come assenti erano metodiche per l'identificazione di mutazioni somatiche in regioni non-coding e in non-coding RNA, inclusi i micro-RNA. Inoltre, fino a pochi anni fa si riteneva che le traslocazioni cromosomiche fossero un evento raro nei tumori epiteliali, ma tipico di neoplasie ematologiche, nelle quali poteva essere osservato grazie a metodiche di citogenetica. La scoperta delle traslocazioni TMPRSS2 (transmembrane protease serin 2) -ERG nel carcinoma della prostata (91) e delle traslocazioni EML4 (echinoderm microtubule-associated protein like4)-ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase) nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, hanno cambiato la prospettiva su questo argomento. (92)

Il sequenziamento dell'esoma, che rappresenta l'1% del genoma, mediante tecniche di NGS rende possibile ottenere un'altissima coverage anche per materiale impuro o in cui sono contenute poche cellule tumorali. Uno studio condotto da Jones e colleghi, in cui è stato sequenziato l'esoma di 68 pazienti affetti da cancro pancreatico, ha identificato nei campioni analizzati varianti germinali che non sono state riscontrate nel genoma di riferimento in seguito alla procedura di mapping. È stato, quindi, approfondito il caso di un paziente affetto da cancro pancreatico familiare, in cui sono state identificate 15,461 varianti germinali a partire da 20,661 geni analizzati. In particolare sono stati identificati 3 geni, SERPINB12, RAGE e PALB2, che vengono ereditati con la mutazione in un allele e successivamente subiscono una mutazione somatica nel secondo allele che avvia il processo oncogenetico. L'assenza di un allele normale del gene responsabile è tipico nei casi in cui il tumore insorge in soggetti con predisposizione familiare al cancro. In particolare PALB2 è un gene noto per il suo ruolo nel cancro della mammella e nell'anemia di Fanconi e la sua mutazione caratterizzata dalla delezione di 4bp che produce un frameshift con formazione di un codone di stop è stata rivelata in questo caso ed è stata correlata alla predisposizione del paziente alla malattia. L'analisi di ulteriori 96 pazienti con cancro pancreatico familiare ha rivelato tre distinte mutazioni che determinano un codone di stop, validando il ruolo di PALB2 come gene di suscettibilità per il cancro pancreatico. Alcune delle pazienti con la mutazione in PALB2 erano affette sia da tumore

pancreatico sia da tumore al seno e di conseguenza questi dati confermano come PALB2 sia correlato a BRCA2, che è il gene più comunemente mutato nei casi di carcinoma pancreatico ereditario. (93)

Il sequenziamento del trascrittoma (RNA-sequencing) anch'esso mediante tecnologia NGS è un importante approccio per la comprensione dei processi oncogenetici, poiché permette l'analisi del trascritto della cellula con la possibilità di individuare eventuali mutazioni somatiche, nuovi trascritti e forme di splicing alternativo. (94) L'analisi dei nuovi trascritti cellulari rappresenta una tecnica innovativa rispetto al gene expression profile, non essendo limitata a regioni geniche note. Uno studio condotto nel 2009 utilizzando la tecnologia della RNA-sequencing ha permesso di identificare una mutazione somatica ricorrente a carico del gene FOLX2, coinvolto nella patogenesi dei tumori dell'ovaio a cellule della granulosa e cioè la sostituzione nucleotidica 402C→G. (95)

Sebbene le piattaforme di NGS siano molto diverse per la biochimica del sequenziamento, dell'amplificazione e della generazione dei cluster di frammenti di DNA, il processo sperimentale è simile: frammentazione casuale del DNA target; ligazione *in vitro* di sequenze adattatrici; amplificazione in cluster dei frammenti mediante emulsion-PCR o bridge-PCR, che genera ampliconi identici confinati spazialmente in una singola posizione dell'*array* o su un substrato solido; sequenziamento ciclico mediante chimiche diverse. Una caratteristica comune di tutti questi sistemi è la capacità di ottenere informazioni da entrambe le estremità dei frammenti di DNA della libreria. A seconda della piattaforma adottata e dell'approccio utilizzato per la costruzione della libreria, il sequenziamento avviene a partire da entrambe le estremità di frammenti lineari (*paired end sequencing*) o da entrambe le estremità di frammenti precedentemente circolarizzati (*mate pair sequencing*). La capacità di ottenere dati da entrambe le estremità è ovviamente vantaggiosa vista la natura altamente ripetitiva del genoma. I vari sistemi sono in grado di produrre miliardi di sequenze di DNA sotto forma di corti frammenti fra i 50 bp e i 75-150, fino ad arrivare ai 400 bp. Il numero di *reads* (letture) può arrivare fino a 6 miliardi, che determinano fino a 600 Gb di dati per corsa.

Uno dei sistemi NGS più utilizzati e tecnologia di riferimento nel nostro studio, è il sistema "Illumina". (96) Questo sistema prevede la frammentazione del DNA da sequenziare, alle cui due estremità vengono legati adattatori che ne permettono l'ancoraggio ad una superficie piana, fungendo così da sito di legame per i primer della PCR. L'amplificazione dei frammenti viene effettuata mediante bridge PCR, che genera i cluster contenenti ciascuno migliaia di copie dello stesso frammento da sequenziare. I reagenti di sequenziamento comprendono il primer complementare ad una porzione degli adattatori, i nucleotidi coniugati a gruppi terminatori reversibili e marcati rispettivamente con 4 fluorofori e la DNA polimerasi. Una volta incorporato il

nucleotide avviene la lettura e successivamente viene eliminato il fluoroforo e il gruppo terminatore al 3' che impedisce l'attacco di un altro nucleotide e il ciclo si ripete. Alla fine della reazione tutte le *reads* ottenute vengono mappate contro un genoma standard di riferimento. In questo modo si ha, quindi, la possibilità di ottenere un quadro onnicomprensivo delle alterazioni genetiche che sono alla base del cancro. La tecnologia NGS continuerà negli anni a venire ad avere un importante impatto nel campo della genomica e la sfida maggiore sarà l'interpretazione della grande mole di dati prodotti, per l'identificazione di quelli biologicamente rilevanti, nella prospettiva di un'applicazione in ambito diagnostico e terapeutico. (97)

4. STUDIO SPERIMENTALE SULLA CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DELL'ADENOCARCINOMA DUTTALE E DELLE LESIONI PRE-CANCEROSE DEL PANCREAS MEDIANTE TECNOLOGIA WHOLE GENOME SEQUENCING E ONCOSCAN ARRAY

4.1. Scopo dello studio

Lo scopo dello studio è la valutazione del profilo delle alterazioni genetiche ricorrenti nel PDAC e nei suoi precursori mediante la tecnica del Whole Exome Sequencing ed Oncoscan Array su campioni provenienti da PDAC nei diversi stadi di malattia ed IPMN. Ci concentreremo su eventi genetici sconosciuti che caratterizzano le diverse fasi della malattia dalle lesioni precursori del carcinoma localizzato e localmente avanzato fino al carcinoma pancreatico metastatico. In particolare, questo progetto sarà condotto su 20 campioni in paraffina che verranno profilati con Oncoscan Affymetrix FFPE. Questo approccio potrebbe aiutare a identificare specifiche alterazioni genetiche già presenti nelle lesioni precursori e di fornire una diagnosi tempestiva e al fine di individuare una terapia mirata atta ad assicurare una risposta efficace. Inoltre 30 biopsie o campioni chirurgici di carcinoma pancreatico e delle lesioni precursore verranno analizzate attraverso WES per mappare completamente le alterazioni genetiche. Le alterazioni genetiche identificate verranno confrontate con il sangue periferico dello stesso paziente per identificare e distinguere le mutazioni somatiche da quelle germinali, e correlare i dati così ottenuti con i dati clinici, come per esempio la progressione del tumore da localizzato a carcinoma pancreatico metastatico.

L'identificazione della *signature* genetica potrebbe inoltre essere di utilità nell'identificare fattori prognostici molecolari e fattori predittivi di risposta ai trattamenti.

Un altro obiettivo potenzialmente perseguibile è l'identificazione di alterazioni genetiche potenzialmente aggredibili con terapie target, per l'effettuazione di vere e proprie “*tailored therapies*”. Mediante l'identificazione di vie del segnale comuni, individuate da uno stesso farmaco.

4.2. Pazienti e metodi

Lo studio è stato condotto secondo i principi espressi nella Dichiarazione di Helsinki e il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i partecipanti. Lo studio è stato in precedenza approvato dal Comitato Etico Indipendente del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi.

Raccolta dei campioni e le caratteristiche del paziente

Previo ottenimento di regolare consenso informato sono stati raccolti 40 campioni di adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) mediante biopsia pancreatica eco-guidata ad intento diagnostico (con utilizzo di aghi di diametro maggiore: 1,2 mm; 18-20 G) o in corso di chirurgia. Per ciascun paziente è stato inoltre prelevato un campione di sangue periferico. Dei 40 campioni raccolti solo 30 sono stati analizzati. Infatti 2 casi sono stati esclusi per diagnosi istologica definitiva non conforme a quella di PDAC, 2 casi per estrazione insufficiente di acido nucleico e 6 casi per scarsa cellularità del materiale da analizzare. Il campione biologico prelevato (dimensioni da 2 a 5 cm) è in parte destinato all'analisi istologica (circa i 2/3 del frustolo), ed in parte destinato all'analisi biologica (circa 1/3 del frustolo). I campioni sono stati conservati in provetta criogenica, immersi in una soluzione RNA later (Ambion) e quindi stoccati in un congelatore a -20°C° fino all'estrazione degli acidi nucleici che è stata effettuata sul materiale biotico, previa conferma istologica di diagnosi di adenocarcinoma duttale pancreatico. L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita con l'AllPrep RNA/DNA kit (Qiagen) per i campioni tumorali e con il QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen) per l'analisi del campione di sangue periferico.

Estrazione DNA da Paraffina per Oncoscan Array

Il DNA è stato estratto dai tessuti paraffinati, usando la macrodissezione manuale. Il DNA è stato estratto utilizzando il micro kit QIAamp DNA (QIAGEN) seguendo il protocollo raccomandato dal produttore e secondo la procedura operativa standard del laboratorio. Il DNA è stato quantificato utilizzando il kit di dosaggio Quantico-PicoGreen dsDNA (Thermo Fisher, Monza, Italia) rispetto a una curva standard di riferimento. La concentrazione dello stock di DNA è stata regolata a 12 ng / µl usando un tampone EDTA TE ridotto (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM disodio EDTA, pH 8)

Sequenziamento Sanger

Le mutazioni sono state analizzate mediante sequenziamento Sanger con primer appositamente progettati sugli esoni 2 e 3. Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Life Technologies, USA) e visualizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio. Successivamente, gli ampliconi sono stati purificati e sequenziati usando la miscela di reazione di BigDye Terminator e analizzati sul sequenziatore 3730 (Applied Biosystems). Tutte le reazioni sono state eseguite in duplicato, incluso il processo di estrazione del DNA.

Oncoscan Assay

Il DNA estratto dai 20 campioni in FFPE ad una concentrazione di 12 ng / μ l sono stati elaborati con il sistema OncoScan FFPE Express 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software Oncoscan Nexus Express (Biodiscovery, Hawthorne, CA) Al fine di rimuovere le alterazioni falsamente positive, abbiamo eseguito uno screening a valle utilizzando come parametro di filtraggio la percentuale di sovrapposizione delle copy number variant fisiologiche da quelle patologiche elencate nel Database delle varianti genomiche (versione DGV di luglio 2015). Inoltre, poiché l'applicazione di questa tecnica al DNA derivato da FFPE, porta un rumore di fondo intrinseco più elevato, che aumenta il numero di chiamate di falsi positivi, in particolare nelle piccole regioni intra-geniche, questo parametro è stato valutato in relazione alla lunghezza dei frammenti.

Quantificazione numero di copie

La quantificazione del numero di copie del cromosoma 3 e in particolare della regione genomica PIK3CA è stata effettuata utilizzando la una Real Time PCR (qPCR) sul sistema Real Time PCR Light Cycler 480 (Roche, Penzberg, Germania). Il dosaggio qPCR è stato eseguito con TaqMan Genotyping Master Mix (Thermo Fisher) e 500 nM di primer TaqMan®Copy Number Assays Robo (Hs02653866) per target chr3 e PIK3CA (Hs02608866_cn) per la regione specifica di 3q.

Fish

La FISH è stata eseguita su campioni di IPMN in paraffina pretrattati utilizzando il kit di reagenti di pretrattamento alla paraffina (Abbott Molecular Inc., Germania) seguendo il protocollo del produttore. Due sonde di Vysis di Abbott Molecular (Abbott Molecular Inc., Germania) per il cromosoma 3 e per il gene MYC e il cromosoma 8 sono state impiegate secondo le istruzioni del produttore. In particolare, la sonda Vysis CEP 3 (D3Z1) SpectrumOrange è stata utilizzata per sondare il DNA Alpha Satellite 3p11.1-q11.1 (arancione), mentre la sonda IGH / MYC / CEP 8 ha identificato il gene IGH su chr14q32 (verde), il Gene MYC su chr8q24 (arancione) e il centromeric 8p11.1-q11.1 (aqua). Le sezioni colorate di ematossilina-eosina (H&E) (4 mm) sono state tagliate, per confermare la rappresentatività del tumore.

Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

L'RNA totale è stato estratto da RecoverAll Total Nucleid Acid Isolation Kit (Ambion ThermoFisher, Monza, Italia) quantificato utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e il cDNA è stato trascritto con la trascrittasi inversa SuperscriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'espressione dell'mRNA è stata analizzata mediante PCR quantitativa utilizzando Light Cycler 480 Real Time PCR System (Roche). Per l'analisi sono stati utilizzati i seguenti test TaqMan (Thermo Fisher Scientific Inc.): PIK3CA (Hs00907957_m1), GATA2 (Hs00231119_m1) e TERC (Hs03454202_s1). Le espressioni geniche relative sono state normalizzate al gene GUSB (Hs00939627_m1) e i dati risultanti sono stati espressi utilizzando il metodo $\Delta\Delta CT$, come raccomandato dal produttore (Bollettino utente n. 2 P / N 4303859, Applied Biosystems). I dati sono stati espressi come media \pm SEM ed erano rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Estrazione dell'RNA e DNA per analisi WES

Dal campione è stato estratto l'RNA e il DNA contemporaneamente mediante kit AllPrep RNA/DNA (Qiagen). Si è proceduto ad aggiungere 10 μ l di β mercaptoetanololo per 1 ml Buffer RLT Plus e a preparare una soluzione di etanolo all' 80%. Il tessuto bioptico è stato rimosso dalla provetta di RNAlater, collocato in azoto liquido e lisato mediante l'ausilio di un pestello. Segue la centrifugazione e l'aggiunta di 600 μ l di Buffer RLT Plus. Il composto lisato ha subito 5 passaggi attraverso una siringa RNAasi-free ed è stato centrifugato per tre minuti alla massima velocità. Successivamente si rimuove il sovrantante e lo si trasferisce in una colonnina AllPrep DNA e si centrifuga per 30 secondi a 8000 g. In seguito si prosegue con la purificazione dell'RNA.

Cellularità del campione

L'adenocarcinoma duttale pancreatico è caratterizzato da una importante quota di cellule desmoplastiche stromali che possono raggiungere il 60-70% delle cellule contenute nei prelievi bioptici. Pertanto per quantificare la percentuale di cellule neoplastiche presenti nei nostri campioni è stata eseguita una stima mediante la presenza e la relativa quantificazione di mutazioni a carico di KRAS nel DNA con tecnologia Sanger sequencing, tenendo conto anche degli eventi di delezioni e amplificazioni del cromosoma 12. Nello studio sono stati inclusi, dunque, solo i campioni con una cellularità tumorale media di $41,9\% \pm 7,5$. Di seguito è riportata l'esemplificazione di alcuni

elettroferogrammi delle mutazioni del codone 12 di K-Ras in diversi pazienti, che mostrano l'ampio spettro di arricchimento di cellule tumorali nel campione analizzato (Fig 7)

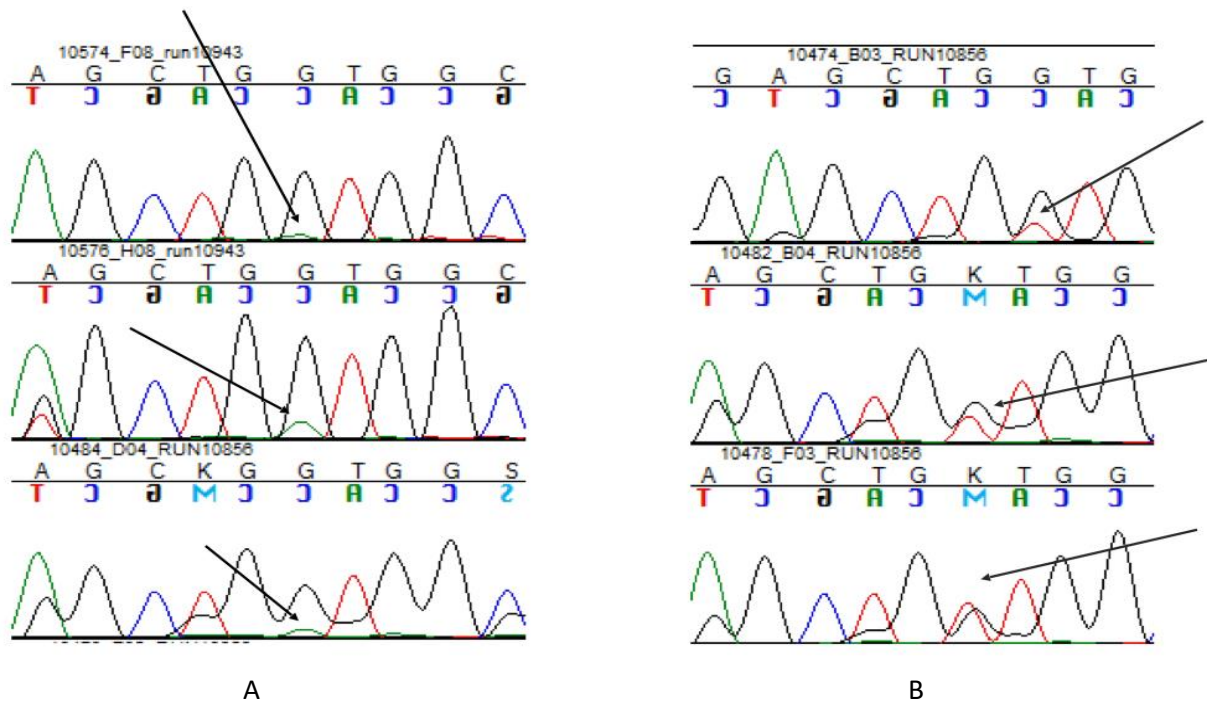


Figura 7: A) Esempi di scarso arricchimento di cellule tumorali; B) Esempi di medio/alto arricchimento.

Purificazione dell'RNA

Si aggiungono alla provetta 430 µl di etanolo al 100% e si centrifuga per 15 secondi a 8000 x g. Si procede con l'aggiunta di 700 µl di buffer RW1 e 500 µl di buffer RPE (quest'ultimo viene aggiunto per 2 volte consecutive) centrifugando di volta in volta.

Si trasferisce la colonnina in una nuova provetta e si aggiungono 30 µl di acqua RNasi-free direttamente nel centro della colonnina e si centrifuga per un minuto alla massima velocità per l'eluizione dell'RNA.

Purificazione del DNA

In una colonnina AllPrep DNA vengono aggiunti 500 µl di buffer AW1 e si centrifuga per 15 s a 8000 x g. In seguito viene eliminato il sovrantante e si aggiungono 500 µl di buffer AW2 e si centrifuga per 2 minuti alla massima velocità. Infine, si trasferisce la colonnina in una nuova

provetta da 1,5 ml, si aggiungono 80 µl di buffer EB e si centrifuga per 2 minuti a 8000 x g per l'eluizione del DNA.

Terminata l'estrazione, il DNA e l'RNA sono stati quantificati mediante misurazione dell'assorbanza a 260nm utilizzando lo spettrofotometro UV-Visibile Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). La purezza del campione estratto è stata valutata mediante stima dei rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230.

Preparazione delle librerie di RNA

Le librerie di RNA messaggero (mRNA) sono state generate mediante il TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) in accordo con le indicazioni del produttore. 250-1000 ng di RNA totale sono stati utilizzati per purificare la frazione di polyA+RNA attraverso un processo di selezione mediato da biglie magnetiche dotate di oligo-poly-T. I polyA+RNA selezionati sono stati frammentati in maniera casuale mediante incubazione nel termociclatore a 94°C per 4 minuti in modo da ottenere dei frammenti con una lunghezza media di 160 bp. Quindi, tali RNA frammentati sono stati retrotrascritti a cDNA a doppio filamento (ds cDNA) mediante SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e Random Examers Primers (Illumina). Successivamente è stata eseguita una fase di purificazione dei ds cDNA dal mix di reazione utilizzata per la retrotrascrizione attraverso il sistema Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). È stata poi eseguita una riparazione e successiva adenilazione delle estremità sporgenti dei ds cDNA secondo quanto indicato dal protocollo Illumina. Previa ulteriore fase di purificazione dei ds cDNA (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter), sono stati addizionati ad entrambe le estremità dei ds cDNA degli adattatori con l'impiego di DNA ligasi I. I prodotti di ligazione ottenuti sono nuovamente purificati (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) e sottoposti ad una fase di arricchimento in cui tramite una reazione di PCR si va ad aumentare selettivamente il numero di copie di frammenti di ds cDNA che presentano gli adattatori ad entrambe le estremità. Questa reazione è eseguita tramite una miscela di primers (PCR Primer Cocktail, Illumina) che si appaiano alla parte finale degli adattatori e il numero di cicli effettuato è ridotto in modo da non alterare la rappresentazione dei vari mRNA nella libreria. Un'ulteriore fase di purificazione (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) conclude il processo di preparazione delle librerie, le quali sono pronte per la validazione e la successiva quantificazione.

Validazione e quantificazione delle librerie La concentrazione delle librerie e la distribuzione dei frammenti delle librerie in termini di dimensioni sono state determinate, in accordo con quanto specificato dal protocollo Illumina, mediante corsa su Chip DNA 1000 nel Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Inoltre, le librerie sono state validate anche mediante PCR quantitativa

(qPCR) con il sistema KAPA SYBR® FAST qPCR Kits (KAPA Biosystems), che permette di confermare la concentrazione delle stesse, nonché di verificare quale percentuale di frammenti contengono gli adattatori ad entrambe le estremità. Infine, è stata effettuata anche una analisi fluorimetrica con il sistema Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen) per avere un'ulteriore misura della concentrazione delle librerie.

Preparazione delle librerie di DNA

Il primo *step* della sintesi delle *library* di DNA prevede la tagmentazione, cioè la frammentazione enzimatica dell'acido nucleico con contemporaneo attacco delle sequenze adattatrici ai lati del frammento. Per questo processo è necessario quantificare con maggior precisione il DNA di partenza, in quanto la dimensione dei frammenti ottenibili dalla tagmentazione è fortemente influenzata dalla quantità di substrato (DNA) presente. Pertanto il DNA estratto dal tessuto tumorale dei pazienti è stato quantificato tramite analisi fluorimetrica con il kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Life Technologies), che utilizza una sonda fluorescente in grado di rilevare solamente la presenza di doppi filamenti di DNA. Per la quantificazione è stata preparata una curva standard con il DNA del fago lambda (λ), per ottenere la concentrazione dei campioni mediante interpolazione dell'assorbanza sulla retta di calibrazione.

Una volta quantificati, i campioni sono stati diluiti con buffer EB fino ad ottenere una concentrazione di 10 ng/ μ l in un volume finale di 10 μ l, necessaria per la preparazione delle *library*. La tagmentazione è stata effettuata mediante l'aggiunta di 25 μ l di Tagment DNA buffer (TD) e 15 μ l di Tagment DNA Enzyme 1 (TDE1) ad ogni campione. Dopo agitazione a 1800 rpm per 1 minuto e centrifugazione a 280 x g per 1 minuto, la piastra è stata incubata a 58°C per 10 minuti. La reazione è stata subito bloccata mediante l'aggiunta di 15 μ l di Stop Tagment buffer (ST), agitazione 1800 rpm per 1 minuto e centrifugazione a 280 x g per un minuto. Dopo aver incubato la piastra a temperatura ambiente per 4 minuti, i frammenti di DNA sono stati catturati e purificati tramite dei lavaggi con delle biglie magnetiche (Sample Purification Beads). Brevemente, i campioni sono stati incubati insieme alle biglie magnetiche per 8 minuti e successivamente è stato eliminato il surnatante posizionandoli su una piastra magnetica. Dopo due lavaggi con 200 μ l di etanolo 80%, i campioni sono stati risospesi con 22.5 μ l di Resuspension Buffer (RSB) staccando i frammenti di DNA dalle biglie. Una volta isolato il sovrnatante contenente i frammenti di DNA, sono stati effettuati 10 cicli di PCR per amplificare i frammenti del DNA, marcandoli con la sequenza indice identificativa del campione. La PCR è stata eseguita aggiungendo: 5 μ l di Index Primer 1; 5 μ l di Index Primer 2; e 20 μ l di Nextera Library Amplification Mix (NLM). I frammenti

amplificati sono stati purificati con le biglie magnetiche, seguendo gli stessi step riportati sopra per la cattura dei frammenti di DNA ottenuti dalla tagmentazione. Successivamente sono state determinate le dimensioni dei frammenti amplificati, mediante corsa elettroforetica su Chip DNA 1000 utilizzando il Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Milano, Italia), per assicurarsi che le dimensioni dei frammenti siano comprese tra le 250 e 400 bp. Dopo quantificazione delle *library* mediante analisi fluorimetrica con Picogreen dsDNA Assay (Life Technologies), sono stati prelevati 500 ng di ogni *library* ed uniti in un unico pool.

Ibridazione e cattura delle sequenze esoniche

Il pool di *library* è stato sottoposto a cattura delle sequenze esoniche tramite sonde specifiche Coding Exome Oligos (CEX), che hanno come target 214126 regioni esoniche per un totale di 37 Mb sequenziabili. La cattura è stata effettuata overnight aggiungendo al pool di *library* 50 µl di Enrichment Hybridization Buffer (EHB) e 10 µl di CEX. Dopo la prima ibridazione, gli esoni sono stati catturati con 250 µl di biglie magnetiche SMB (Streptavidin Magnetic Beads). Utilizzando una piastra magnetica, sono stati effettuati due lavaggi con 200 µl di Enrichment Wash Solution (EWS). Successivamente, la piastra è stata incubata a 50°C per 30 minuti ed è stato eliminato il sopranatante. Il DNA legato alle sonde è stato poi denaturato tramite l'aggiunta di NaOH, permettendo così l'eluizione del DNA esonico catturato. Gli *step* di ibridazione con le sonde, cattura degli esoni ed eluizione sono stati effettuati due volte, seguendo gli stessi passaggi descritti sopra in modo da garantire una selezione più specifica delle regioni catturate. Il campione è stato successivamente purificato aggiungendo 45 µl di Sample Purification Beads (SPB) e dopo due lavaggi con 200 µl di etanolo 80% le regioni catturate sono state eluite dalle biglie in 27.5 µl di Resuspension Buffer (RSB). Successivamente i frammenti di DNA esonici sono stati amplificati con 10 cicli di PCR. Per l'amplificazione, ai 25 µl di sopranatante contenente le *library* di esoma sono stati aggiunti 5 µl di PCR Primer Cocktail (PPC) e 20 µl di Nextera Enrichment Amplification Mix (NEM). Gli amplificati ottenuti sono stati purificati aggiungendo 90 µl di biglie magnetiche (Sample Purification Buffer), facendo due lavaggi con 200 µl di etanolo 80 % ed aggiungendo 32 µl di Resuspension Buffer (RSB) come nel passaggio descritto sopra. Una volta prelevati 30 µl di *library* purificate si è proceduto con la loro validazione e titolazione. È stata determinata la dimensione del pool di *library* dopo la cattura tramite il Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) e la concentrazione mediante PicoGreen dsDNA Assay (Life Technologies). Con queste due tecniche è stato possibile ottenere la concentrazione in molarità delle *library* attraverso il seguente calcolo:

$$\frac{\text{concentrazione library } (\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}) \times 10^6}{650 \times \text{dimensione library (bp)}} = [\text{nM}]$$

Utilizzando come fattore di correzione la dimensione dei frammenti del DNA del fago λ (650).

Una volta calcolata la concentrazione, è stata effettuata una diluizione intermedia a 20 nM e dopo ulteriore quantificazione con PicoGreen dsDNA Assay, il pool di *library* è stato in fine diluito a 2 nM.

Generazione dei cluster e sequenziamento mediante Illumina HiScanSQ

Una volta ottenuta la concentrazione di 2 nM, 10 μl di *library* sono state denaturate per cinque minuti mediante l'aggiunta di 10 μl di NaOH 0.1 N. La denaturazione è stata bloccata con 980 μl di buffer HT1, ottenendo così una concentrazione finale di 20 pM. Successivamente i campioni sono stati diluiti ulteriormente con altro buffer HT1 ad una concentrazione ottimale, 14 pM, per poter essere caricati sulla *flowcell* di sequenziamento.

I campioni così concentrati sono stati ibridati ed amplificati a ponte sulla *flowcell* mediante il sistema cBot Cluster amplification system, utilizzando il kit TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina).

Una volta preparata la *flowcell*, le *library* sono state sequenziate mediante SBS Kit v-3HS (Illumina) nel sequenziatore HiScanSQ (Illumina). Come calibratore di fluorescenza è stata scelta una lane di controllo ed ogni *library* è stata letta con *read* di 100 bp in modalità *paired-end*.

Analisi bioinformatica dei dati

Allineamento e chiamata delle varianti

Nella fase di *base-calling* i segnali di fluorescenza sono stati acquisiti da un sistema interconnesso (*data-pipeline system*) che converte le immagini in chiamate nucleotidiche generando i file FASTQ i quali contengono le *read* corrispondenti alle sequenze acquisite. Una volta terminato il processo di sequenziamento, le *read* hanno subito un primo processo di controllo della qualità e successivamente sono state mappate sul genoma di riferimento attraverso il software TopHat2/BowTie2, generando un file BAM (Binary Alignment Map). Dopo la rimozione dei duplicati di PCR si è proceduto con l'identificazione di varianti a singolo nucleotide (SNVs), inserzioni e delezioni (indels). Tale procedura è stata condotta con il software GATK. I dati ottenuti sono stati filtrati secondo i seguenti parametri di qualità:

- esclusione di SNV con *strand bias* FS > 60 e INDEL con FS > 200, per eliminare le varianti non confermate su entrambi gli strand di DNA
- esclusione di “*Hard to validate variants*”, cioè alterazioni presenti in quattro o più allineamenti con *quality score* uguale a zero e con più del 10% delle *reads* mappate in modo non univoco
- *Quality score* > 30 per le SNV e > 10 per le indels
- *Truth sensitivity* del 99%, per eliminare i falsi positivi
- *Variant confidence* > 2, per rimuovere artefatti o falsi positivi
- *ReadPosRankSumTest* < -8.0 per le SNV e < 20.0 per le indels, effettuando il test statistico Mann Withney per valutare la distanza della mutazione dalla parte terminale delle *read*
- *Coverage* delle *read* ≥ 3 per le SNV
- *Haplotype score* < 13 per le SNV

Infine sono state eliminate le varianti ottenute dal sequenziamento dell'esoma di 25 individui sani, che si presentavano in almeno 3 individui su 25. Inoltre è stata verificata la correttezza degli allineamenti attraverso la funzione *tview* del software SAMtool.

Annotazione e filtraggio delle varianti

L'annotazione delle varianti ottenute è stata effettuata mediante ANNOVAR. Questo software è in grado di filtrare la variabilità umana, ovvero di eliminare dal set di varianti ottenute i polimorfismi (definiti come varianti con frequenza > 1% nella popolazione considerata) presenti nelle banche dati pubbliche (nel nostro caso dbSNP – release 137 e 1000 Genomes – release aprile 2012). Il software permette inoltre di connotare la variante in termini di localizzazione all'interno del gene (ad es. regione esonica, intronica, di *splicing*), del tipo di mutazione (sinonima, non sinonima, *frameshift*, ecc) e della relativa variazione amminoacidica a livello della proteina corrispondente.

Per effettuare la prioritizzazione delle varianti ottenute sono state adottate due tipologie di filtraggio:

a. Filtraggio a bassa stringenza

Per individuare tutte le possibili varianti coinvolgenti i geni predisponenti il feocromocitoma (geni di suscettibilità), su tutte le varianti individuate mappanti in queste regioni sono stati imposti dei filtri a bassa stringenza. I parametri selezionati sono i seguenti:

- Tipo di mutazione: esonica, *splicing*, intronica con una distanza massima di 50 bp da un esone

- Effetto mutazione: non sinonima, delezione o inserzione *frameshift* e *non-frameshift*, *stopgain* e *stoploss*. In questo modo sono state tolte solo le mutazioni sinonime e le non annotate sui database, come i trascritti non codificanti (*unknown*).
- Frequenza su 1000 genomi $< 0,02$ o non annotata (NA)
- *Tumor Ratio* (numero *read* con allele mutato rispetto al numero totale delle *read* mappate in quella posizione) $> 20\%$

b. Filtraggio ad alta stringenza

Successivamente si è voluto invece individuare e selezionare le varianti deleterie coinvolgenti nuovi possibili “geni candidati” legati alla patologia. Sull’intero pannello di varianti individuate è stato quindi impostato un filtraggio a maggior stringenza con: valore minimo di *coverage* totale (numero di *read* che mappano nella posizione genomica della mutazione) > 15 , *Tumor Ratio* $> 20\%$ e frequenza su 1000 genomi $< 0,01$ o non annotata. Inoltre, sono state considerate solo le varianti con effetto sulle regioni codificanti, eliminando le mutazioni introniche e le *non-frameshift*. Al fine di valutare una possibile associazione tra la mutazione e la patologia, è stato analizzato, mediante l’utilizzo di diversi software di predizione, l’effetto sulla proteina delle varianti nelle regioni codificanti (PROVEAN e SNP&GO) e nelle regioni introniche (Alternative Splice Site Predictor, Gene Splicer, GENSCAN e SplicePort).

Le varianti così ottenute sono state quindi analizzate utilizzando il software online Oncotator (<http://www.broadinstitute.org/oncotator/>), al fine di annotare le mutazioni sulla base delle informazioni ottenute da diversi database, tra cui:

- Cancer Gene Census (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/census/>), contenente l’elenco di tutti i geni “*cancer related*”, le cui mutazioni sono state associate alla tumorigenesi
- COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>), database di annotazione delle mutazioni somatiche in diversi istotipi tumorali
- Familial Cancer Database (<http://www.familialcancerdatabase.nl/>), database contenente mutazioni in geni responsabili di disordini familiari
- Tumorscape (<http://www.broadinstitute.org/tumorscape/pages/portalHome.jsf>) e TCGA Copy Number Portal (<http://www.broadinstitute.org/collaboration/gcc/293>), contenenti le informazioni su regioni cromosomiche frequentemente amplificate o delete nei tessuti tumorali.

5. RISULTATI

Dati clinicopatologici

Le sezioni dei vetrini colorati con ematossilina ed eosina mostrano la differenza tra il normale tessuto pancreatico e IPMN (Fig. 8A-B). Gli IPMN sono stati classificati, secondo l'OMS 2010. Dei 20 IPMN 9 (45%) erano multifocali, 7 (35%) erano nella testa del pancreas e 4 (20%) riguardavano la coda del pancreas. Macroscopicamente 14 campioni (70%) erano di tipo misto, mentre 4 (20%) di tipo condotto-condotto e 2 (10%) di tipo condotto principale. In 4 IPMN (20%) sono state identificate aree di carcinoma microinvasivo (<1 mm), mentre due (10%) sono state associate a un carcinoma invasivo (Tabella 4)

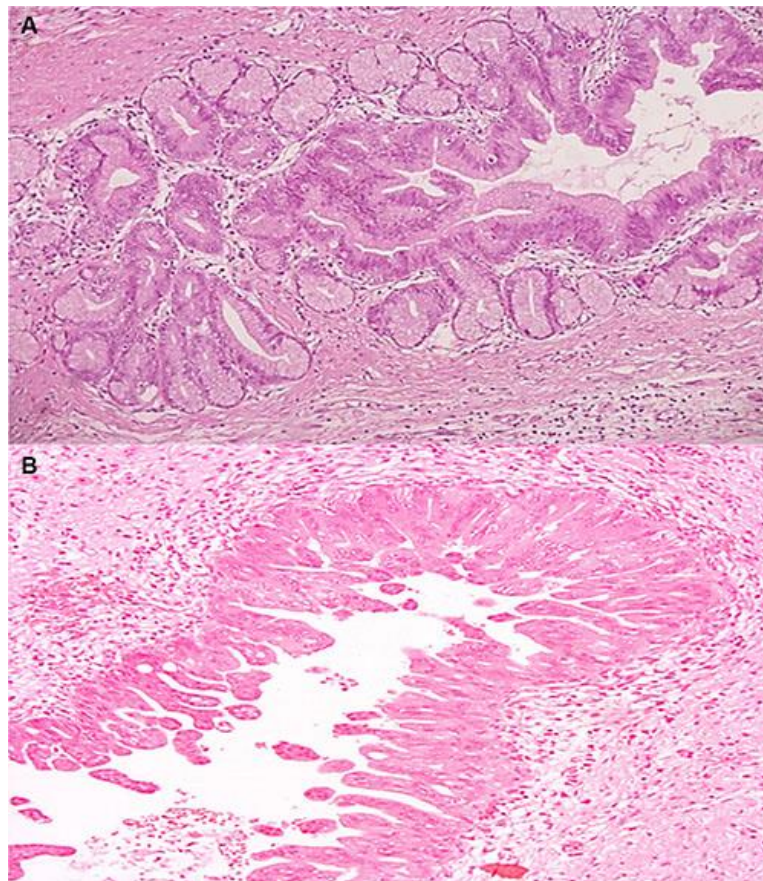


Figura 8: (A – B) Sezioni di ematossilina ed eosina di IPMN. (A) La sezione microscopica del campione mostra un dotto del ramo pancreatico con IPMN di tipo gastrico di grado intermedio basso (H&E \times 20). (B) Lasezione microscopica del campione mostra un condotto principale del pancreas con IPMN di tipo pancreaticobiliario di alto grado (H&E \times 20).

Tabella 4: Dati dei pazienti con IPMN, classificazione secondo l'OMS 201

Dati demografici e istopatologici	
Età – anni	
Median	71
Range	55-84
Sesso – no. (%)	
Femmine	9 (45)
Maschi	11(55)
Sito – no (%)	
Testa/processo uncinato	7 (35)
Testa/Corpo	3 (15)
Corpo/Coda	2 (10)
Coda	4 (20)
Diffuso	4 (20)
Tipo-no (%)	
I- Main duct	2(10)
II- Branch duct	4(20)
III- Mixed type	14(70)
Istotipo – no (%)	
Pancreaticobiliare	6 (30)
Gastrico	2 (10)
Gastrico/pancreaticobiliare	10 (50)
Intestinale	1 (5)
Oncocistico	1 (5)
Lesioni – no (%)	
Basso grado	3 (15)
Grado intermedio	4 (20)
Alto grado	13 (65)
Associato carcinoma – no (%)	
Invasivo	2 (10)
Microinvasivo(<1mm)	4 (20)

Analisi mutazionale

Mutazioni sono state identificate utilizzando il tool informatico Affymetrix Somatic Mutation Viewer, e successivamente validate mediante Sanger Sequencing (Tabella 5).

3/20 IPMN hanno mostrato una mutazione in Kras (esoni 2 o 3), 5/20 IPMN ha mostrato una mutazione in TP53.

Tabella 5: Associazione tra il grado di displasia e la presenza di mutazioni di KRAS e TP53 e il numero di copy number

Campioni	Displasia	Gains	Losses	Mutazioni
Onco009	Intermedio	0	0	
Onco013	Intermedio	0	0	
Onco014	Basso grado	0	0	
Onco004	Basso grado	1	0	
Onco010	Intermedio	1	0	
Onco011	Intermedio	1	0	
Onco012	Basso grado	1	0	
Onco025	Alto grado	5	14	
Onco015	Alto grado	5	2	Tp53 (G245S)
Onco026	Alto grado	4	0	Tp53 (G245S)
Onco024	Alto grado	5	0	
Onco017	Alto grado	7	3	
Onco008	Alto grado	5	0	
Onco020	Alto grado	6	0	
Onco019	Alto grado	7	10	Kras (G12V) Tp53(G245S)
Onco016	Alto grado	10	1	Tp53(R249S)
Onco021	Alto grado	5	1	
Onco022	Alto grado	8	10	Tp53 (G245S)
Onco018	Alto grado	6	1	Kras (G12D)
Onco023	Alto grado	17	0	Kras (G12V)

Profilo citogenico degli IPMN mediante Oncoscan Array

Sono stati selezionati in maniera retrospettiva 20 casi di IPMN con differenti stadi di displasia e differenti istotipi ed è stata verificata la presenza di alterazioni genetiche mediante Oncoscan Array. I dati generati sono stati analizzati con il programma Nexus che si basa su un algoritmo che permette di distinguere le cellule tumorali dalle cellule sane e fare l'analisi di copy number solo sulla quota di cellule malate. L'analisi con Oncoscan ha permesso di dividere la casistica in 2 categorie:

- 7 IPMN presentavano un cariotipo quasi normale, con nessuna o una alterazione focale;
- 13 IPMN avevano un cariotipo complesso, con più di 4 alterazioni ciascuno.

Il numero medio di alterazioni nei casi complessi è stato 10 per ogni paziente. Dall'analisi è emerso che il numero di alterazioni è legato al grado di displasia suggerendo la presenza di differenze genetiche anche all'interno dei sottogruppi dell'IPMN a seconda del grado. (Fig. 9).

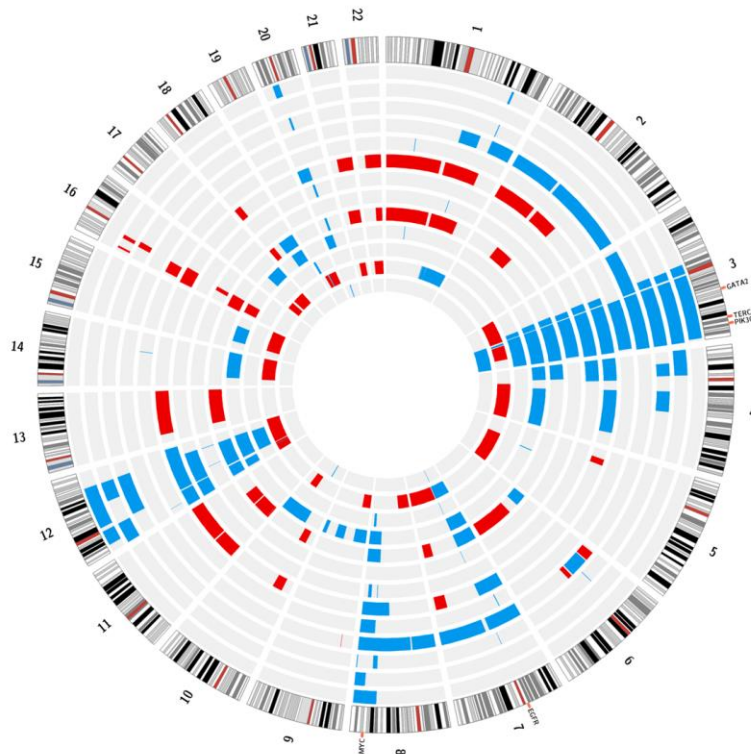


Fig.9: Circol plot delle regioni con alterazioni statisticamente significative del numero di copie nell'IPMN con cariotipo complesso. Le caselle rosse e blu indicano rispettivamente unloss o un gain delle numero di copie.

Lo stato del cariotipo era fortemente correlato al grado istologico, poiché tutti e 13 i casi con displasia di alto grado avevano un cariotipo complesso, rispetto al 7 casi con cariotipo normale che mostrava solo displasia di basso grado / intermedio ($p < 0,0001$, test esatto di Fisher).

Focalizzando l'attenzione sulle alterazioni degli IPMN a cariotipo complesso si è visto un gain ricorrente e specifico del braccio cromosomico 3q in 12 su 13 (92%) di IPMN con cariotipo complesso (Fig. 10), che comprende oncogeni noti come PIK3CA, GATA2 e TERC legati alla deregolamentazione della crescita cellulare e alla progressione della malattia. Questa specifica alterazione è stata quella più significativamente associata al grado di displasia ($p = 0,0001$).

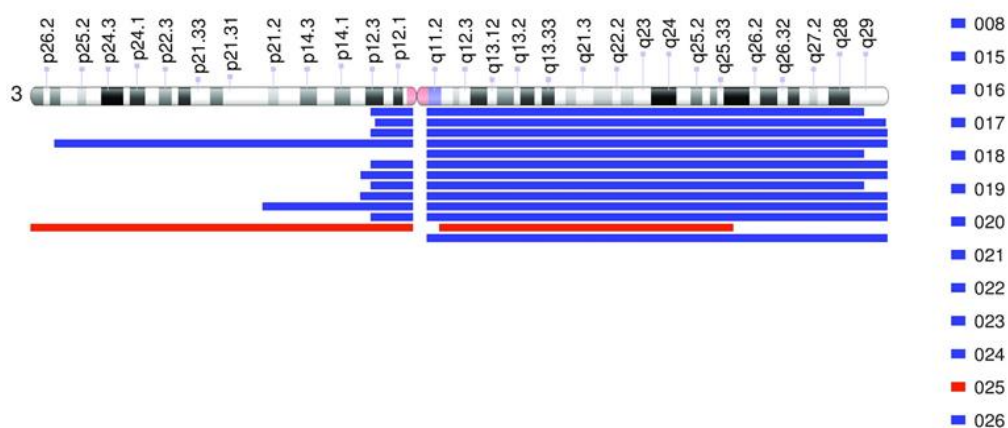


Fig.10: IPMN con cariotipo complesso con gain del 3q (blu)

Oltre al gain del cromosoma 3q, sono state riscontrate in maniera ricorrente altre alterazioni a carico del chr 8q, chr 12, chr 7, chr 16, chr 21 e chr 22.

Nell'IPMN con cariotipo complesso una seconda alterazione ricorrente identificata in questo studio è stata il guadagno (gain) del braccio cromosomico 8q (45%) in cui risiede l'oncogene MYC. L'aumento del numero di copie del gene MYC è stata validata mediante analisi FISH (Fig.12 C). È interessante notare che in quasi la metà dei pazienti con displasia di alto grado abbiamo anche osservato un ulteriore gain nel cromosoma 7p11, dove si trova il gene EGFR, e un gain del chr 12, dove si trovano MDM2 e KRAS (40%).

Gain 3q evento ricorrente nel IPMN a cariotipo complesso

L'analisi di copy number mediante Real time PCR, eseguita utilizzando primers localizzati sul 3p, ha confermato l'amplificazione del cromosoma 3 in IPMN con cariotipo complesso rispetto a IPMN con cariotipo normale con un p-value di 0,008 (Fig. 11A). Concentrandosi in maniera specifica sul gene PIK3CA, l'analisi di copy number mediante Real time PCR ha confermato l'aumento del numero di copie di questa regione genomica in IPMN con cariotipo complesso. (Fig. 11B).

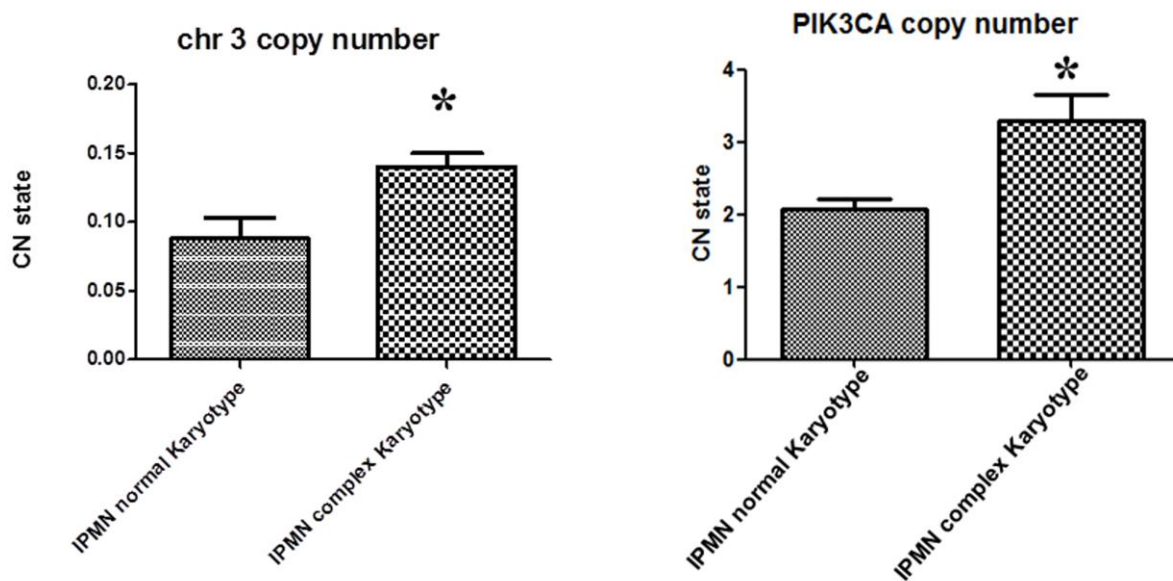


Fig.11 (A) Cromosoma 3 copy number in IPMN con cariotipo complesso comparator con quelli a cariotipo normale. con p-value<0.008. (B) qPCR del gene PIK3CA, conferma dell'amplificazione di questa regione negli IPMN con cariotipo complesso con p-value<0.004

Anche l'analisi FISH ha confermato la presenza di un gain di chr3 in circa il 60% delle cellule (Fig. 12D). Abbiamo utilizzato FISH per rilevare le variazioni del numero di copie di cinque marcatori cromosomici. L'analisi FISH ha mostrato un guadagno del braccio cromosomico 3q in pazienti con IPMN complessi. Cariotipo rispetto al cariotipo normale IPMN, a conferma dei dati ottenuti dal saggio dell'intero genoma.

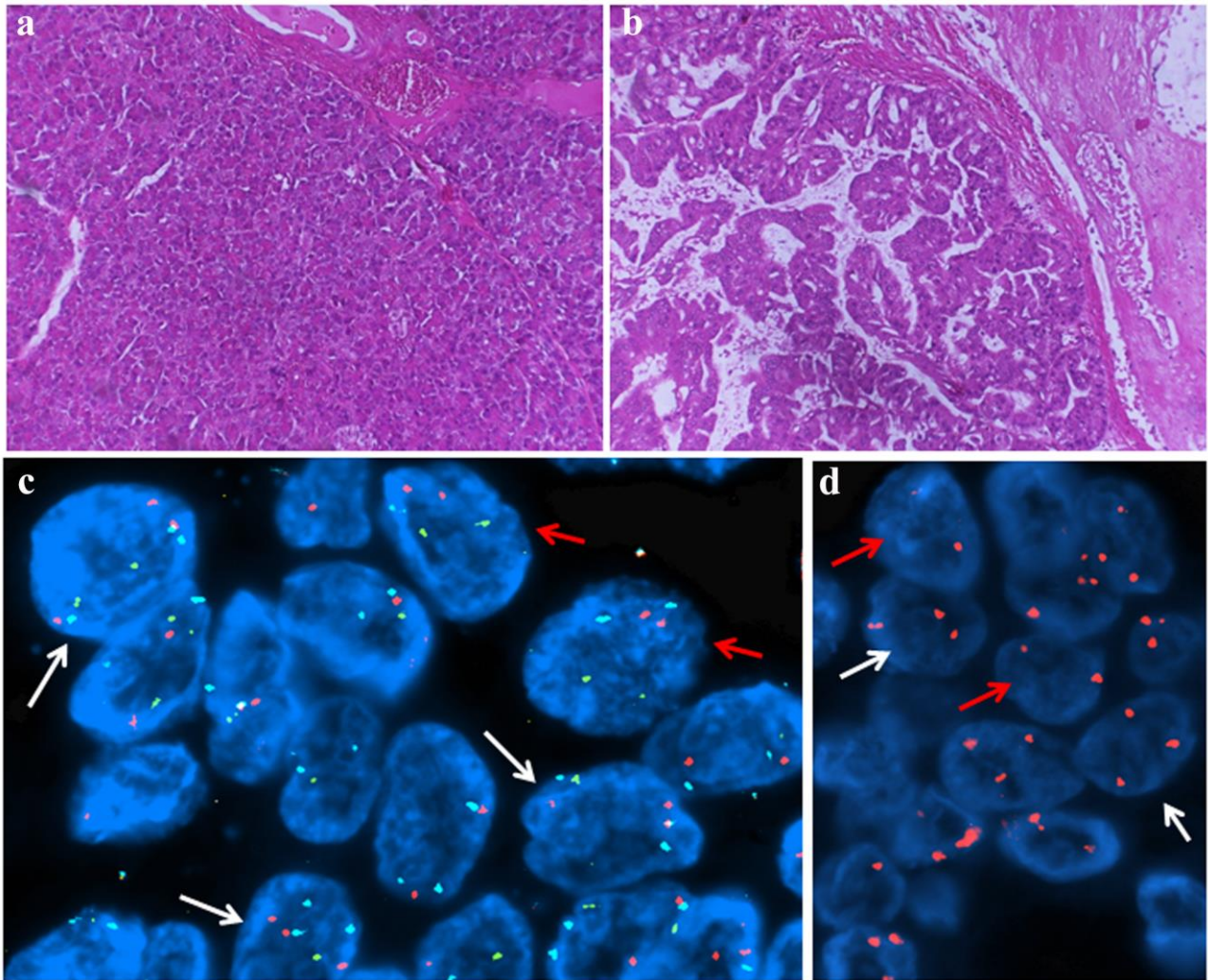


Figure 12. (A-B) Colorazione istologica mediante ematossilina eosina mostrano sezione di Pnacreas normale (A) ed IPMN (B). (C-D) Analisi FISH (C) copy number gain del gene MYC sul chr 8: circa il 50% delle cellule mostra tre segnali per il gene MYC. (D) Il 60% of delle cellule mostra 3 segnali per il cromosoma 3

L'espressione dell mRNA di PIK3CA, GATA2 e TERC, sono stati valutati mediante RT-PCR I risultati hanno mostrato una up regolazione di 4 volte superiore di PIK3CA nei campioni di IPMN con cariotipo complesso rispetto a quelli con cariotipo normale con $p < 0,0004$ (Fig. 13A). L'espressione TERC è 2 volte sovraregolata negli IPMN con cariotipo complesso con valore $p < 0,01$ (Fig. 13B), mentre l'espressione di GATA2 non mostrava alcuna differenza tra i due gruppi (Fig. 13C).

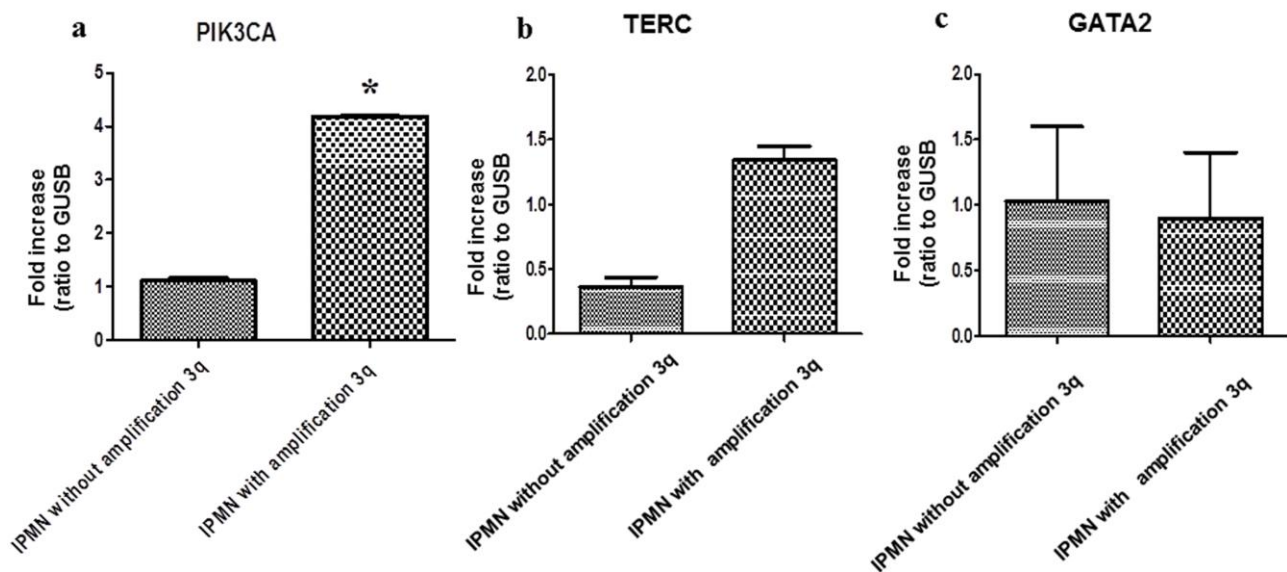


Figure 5 (A) Real Time di PIK3C in IPMN con gain del 3q comparato con IPMN senza il gain del 3q. (B) Real Time di TERC in IPMN con gain del 3q comparato con IPMN senza il gain del 3q. (C) Real Time di GATA2 in IPMN con gain del 3q comparato con IPMN senza il gain del 3q.

Analisi dati RNA-seq e WES

Sono stati analizzati 30 campioni di PDAC, mediante tecnica RNA-seq (9 campioni) e WES (21 campioni). Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 6. In questo studio sono stati identificati 43 geni alterati ricorrenti, che sono coinvolti in numerose vie di segnale. I dati attuali hanno confermato la presenza di mutazioni cardine già identificate in letteratura come KRAS, TP53, CDKN2A e SMAD4, con frequenze rispettivamente del 100%, 60%, 16% e 10%. Come previsto, KRAS ha mostrato la più alta prevalenza di mutazioni somatiche; le mutazioni hanno interessato l'hotspot noto al codone 12 (G12D, G12V, G12R e G12C rispettivamente in 16, 8, 4 e 2 pazienti). Altri geni mutati con elevata frequenza identificati in questo studio sono stati: MUC4, GNAS, SMAD4, TGFBR2, FLG, OR10Z1, SMARCA2, DNAH14, TTN, BAI1, RALGAPB, RNF43, PBRM1, OBSCN, PRRC2C, CCDC168, AIM1L, E4F1 e POM121L12 (Fig.14).

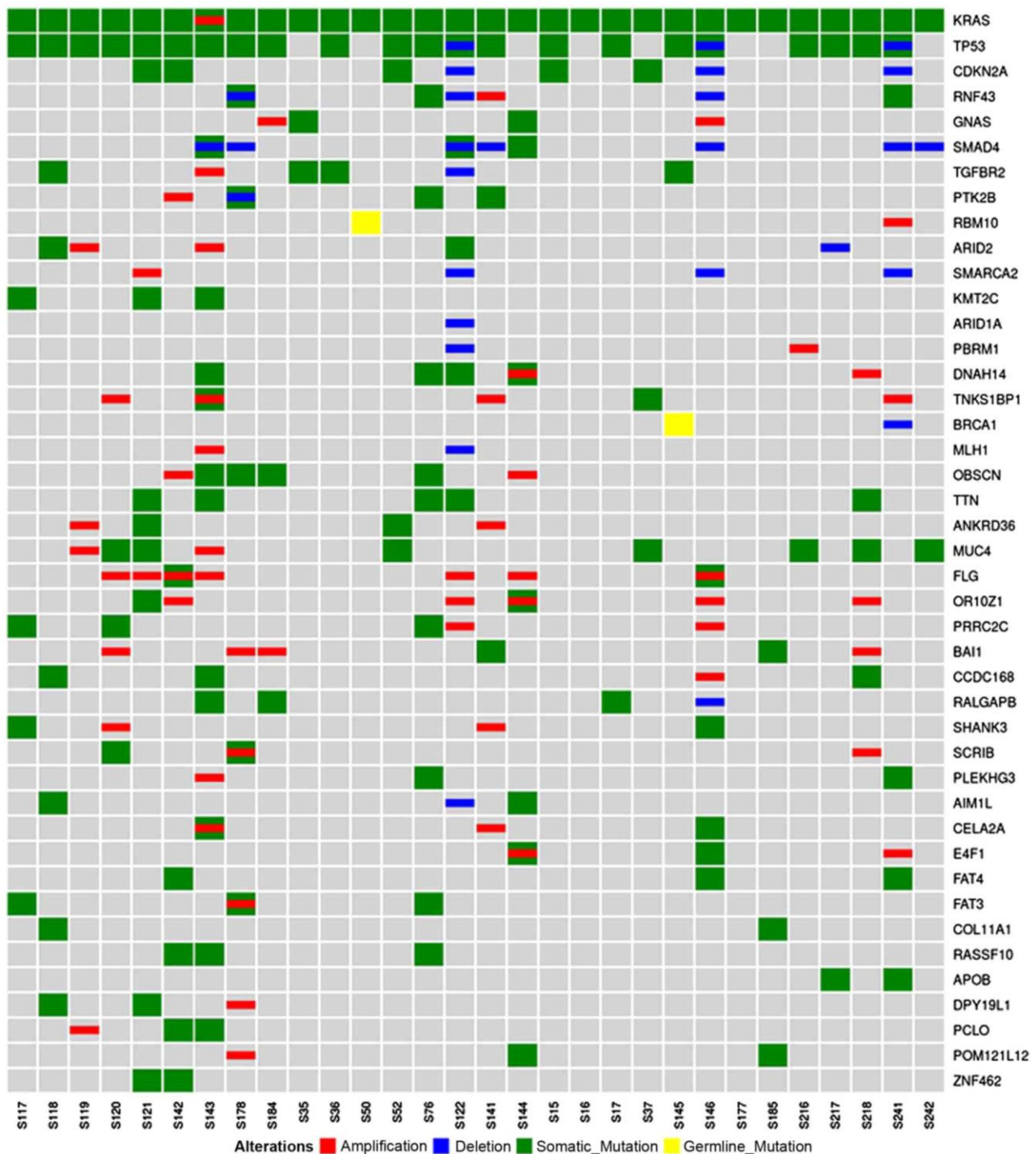


Fig.14 I geni sono presentati lungo il lato destro e ogni campione è presente lungo il fondo. Rosso, amplificazioni; blu, delezioni; mutazioni somatiche verdi e; mutazioni germinali gialle. I risultati hanno confermato l'alta frequenza delle mutazioni di KRAS, TP53, CDKN2A e SMAD4 nell'adenocarcinoma del dotto pancreatico;

L'analisi delle vie di segnale ha inoltre dimostrato che i geni con una maggiore frequenza di aberrazioni clusterizzavano in specifiche vie di segnale: KRAS signalling, TGF- β signalling, rimodellamento della cromatina, Wnt signalling, riparazione del danno al DNA, ciclo cellulare; processamento del RNA (Fig.15).

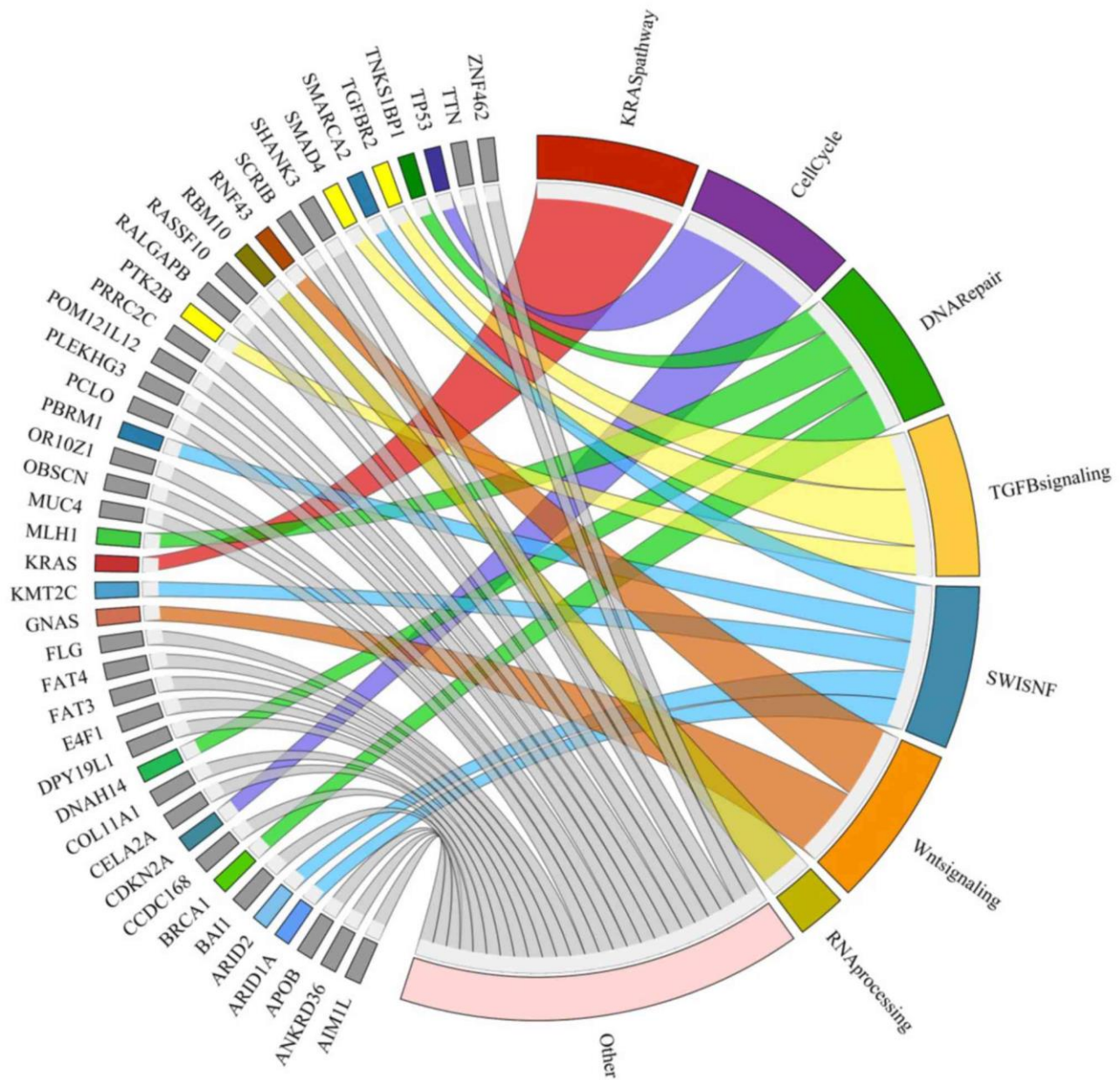


Fig.15. I geni con un'alta frequenza di aberrazioni, come presentati sul lato sinistro dell'immagine, sono stati raggruppati in percorsi specifici, come presentato sul lato destro. Le connessioni sono colorate. I percorsi più frequentemente rilevati includevano segnalazione KRAS, segnalazione TGF- β , rimodellamento della cromatina, segnalazione Wnt, riparazione del danno al DNA, ciclo cellulare ed elaborazione dell'RNA. KRAS, proto-oncogene KRAS, GTPase; TGF- β , trasformando il fattore di crescita- β .

Per comprendere quali potessero essere le mutazioni driving del PDAC, sono state condotte analisi di correlazione dei dati mutazionali e clinici solo nei pazienti in fase precoce di malattia (pazienti con PDAC primari, operabili e non trattati). L'OS mediana dei due gruppi, stimata utilizzando un'analisi Kaplan-Meier, era di 46 e 13 mesi per i pazienti classificati rispettivamente nei gruppi di sopravvivenza lunghi e corti (Fig. 16). I dati di letteratura riportano una sopravvivenza globale (OS) a 5 anni del 25% nei pazienti PDAC sottoposti a resezione chirurgica; tuttavia la maggior parte di questi sviluppa una recidiva dopo la resezione. Sulla base di 25 mesi come valore soglia, i pazienti sono stati divisi in due sottogruppi; il sottogruppo con il sistema operativo migliore (> 25 mesi) ha ospitato una media di 24 eventi, mentre il sottogruppo con il sistema operativo peggiore (<25 mesi) ha presentato una media di 40 mutazioni ($P = 0,047$) (Fig. 17).

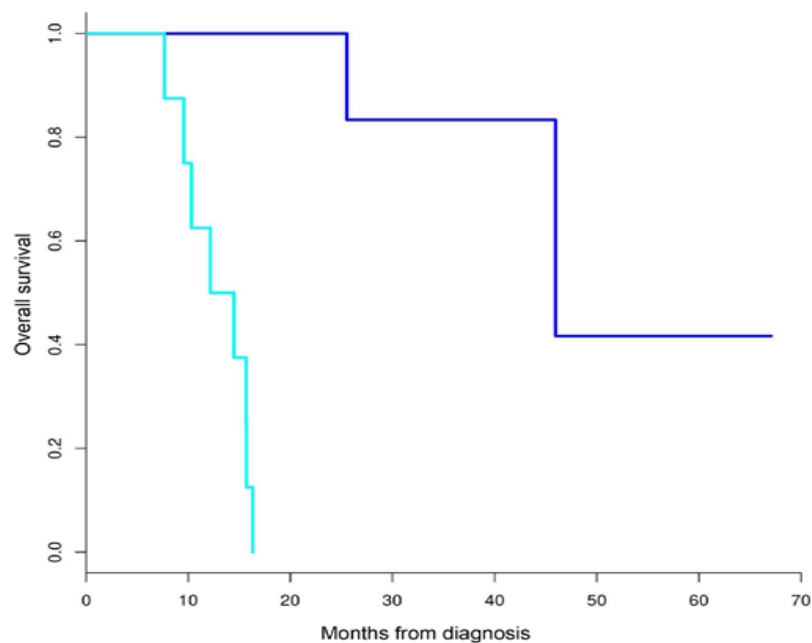


Fig.16 Mediana di overall survival dei pazienti in fase iniziale suddivisi in lungo sopravvissuti da corto sopravvissuti determinati da analisi Kaplan-Meier. Blu scuro gruppo lungo sopravvissuti; Blu chiaro corto sopravvissuti.

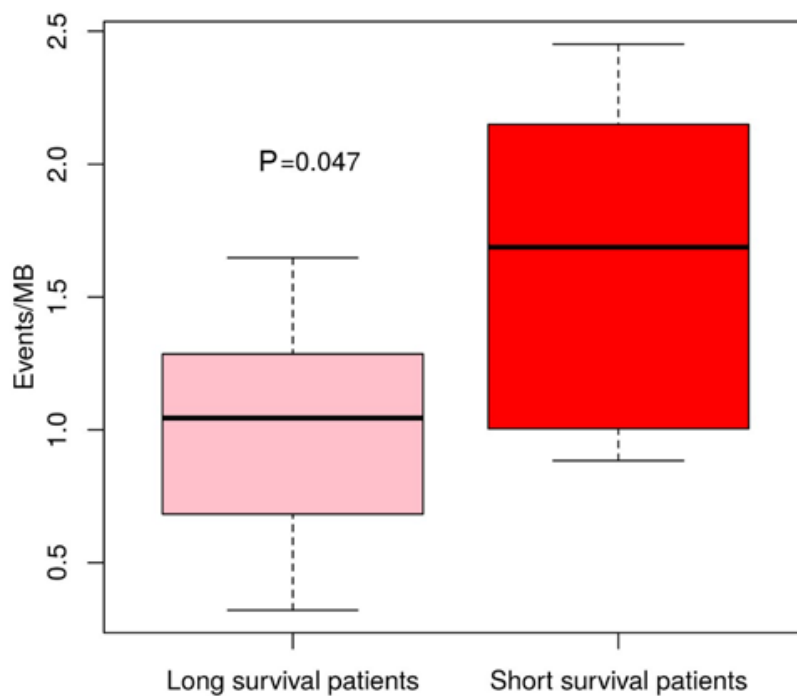


Fig.17: Sulla base di 25 mesi come valore soglia, i pazienti sono stati divisi in due sottogruppi, con sopravvivenza globale lunga (> 25 mesi) e breve (<25 mesi), rispettivamente. L'istogramma rappresenta gli eventi / MB in due sottogruppi. I campioni del lungo gruppo di sopravvivenza contenevano una media di 24 eventi, mentre i campioni del breve gruppo complessivo possedevano un medium di 40 mutazioni (P = 0,047).

Valutando il carico mutazionale il presente studio ha dimostrato che i campioni del sottogruppo a migliore OS possiedono meno alterazioni genomiche rispetto ai campioni del sottogruppo a peggiore OS (valori medi rispettivamente di 24 e 40 mutazioni).

Nel presente studio, è stata identificata in campioni ottenuti da pazienti sottoposti a resezione chirurgica un'elevata prevalenza di mutazioni (33%) nel gene MUC4 suggerendo così la sua importanza nella carcinogenesi del PDAC.

La delezione di RNF43 è stata rilevata solo in due casi con PDAC associato a neoplasia mucillare papillare intraductal (IPMN) nel gruppo a lunga sopravvivenza. Mutazioni inattivanti il gene RNF43, che codifica per una proteina con attività intrinseca U3 ubiquitina ligasi, sono stati riportati in IPMN del pancreas. Secondo uno studio precedente, IPMN ha una prognosi migliore rispetto al PDAC convenzionale, e l'identificazione nel presente studio di delezioni di RNF43 solo nel gruppo a lunga sopravvivenza supporterebbe tale ipotesi.

Altri geni ricorrenti alterati da mutazioni puntiformi, delezioni o amplificazioni sono GNAS,

SMAD4, recettore TGF- β 2 (TGFB2), filaggrin (27%), correlato a SWI / SNF, associati alla matrice, regolatore della actina dipendente dalla cromatina, sottofamiglia a, membro 2, dynein axonemal heavy chain 14, titina, recettore B1 accoppiato con proteine dell'adesione B1, subunità β catalitica non catalitica attivante le proteine Ral (20%), proteina anulare 43 (RNF43), polibromo 1, oscurina, calmodulina citoscheletrica e RhoGEF interagente con titina, ricco di prolina bobina a spirale 2C, dominio a spirale spirale contenente 168, dominio $\beta\gamma$ cristallino contenente 2, fattore di trascrizione E4F 1 e proteine simili a POM121 n 12 (POM12L12) (13%).

Tuttavia, non sono stati correlati geni o percorsi specifici con OS.

6. DISCUSSIONE

L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDA) è, ad oggi, la quarta causa di morte per patologia oncologica nel mondo occidentale, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni pari a circa il 5%. La forma precancerosa del PDA, Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN), si presenta come una patologia di sempre maggiore interesse, in virtù dell'incremento delle diagnosi incidentali legata ad un maggiore impiego dell'imaging addominale negli ultimi decenni, e ha una prevalenza di 99 casi su 100.000 abitanti nella popolazione con età superiore ai 60 anni. L'attività svolta durante il primo anno di dottorato ha avuto come obiettivo l'identificazione delle alterazioni genetiche ricorrenti nell'IPMN. Sotto il profilo anatomico e istologico questo tipo di lesioni è stato ampiamente caratterizzato. Infatti morfologicamente le IPMN vengono suddivise in base alla comunicazione con il dotto principale o con i dotti periferici, mentre sulla base della differenziazione cellulare si riscontrano 4 istotipi (intestinale, gastrico, bilio-pancreatico ed oncocitico). È noto che differenze in termini di morfologia e di anatomia patologica corrispondono ad una differente tendenza ad evolvere verso forme di crescite malignità e che a partire da diversi tipi istologici si sviluppano diverse forme di carcinoma, quali carcinoma colloide per l'istotipo intestinale, la forma oncocitica. Inoltre, recenti studi mostrano che differenti sottotipi istologici hanno solo una parziale sovrapposizione dello spettro mutazionale. In particolare è stato osservato che mutazioni di GNAS e KRAS sono presenti tipicamente nell'istotipo intestinale e gastrico e si ipotizza che possano essere eventi precoci nella carcinogenesi dell'IPMN; al contrario mutazioni di TP53 sono state identificate solo nelle lesioni ad alto grado suggerendo come questo tipo di mutazioni possano essere valutate come marker di displasia ad alto grado. Alla luce di queste osservazioni l'obiettivo del primo anno di dottorato è stato quello di analizzare casi di pazienti con IPMN allo scopo di individuare quali siano le alterazioni genetiche presenti fin da questo primo stadio della malattia. Sono stati selezionati in maniera retrospettiva 20 casi di IPMN con differenti stadi di displasia e differenti istotipi ed è stata verificata la presenza di alterazioni genetiche mediante Oncoscan Array. L'Oncoscan è un tipo di chip che permette di avere una discovery sulla presenza dei soli oncogeni e quindi un'analisi di copy number; inoltre permette di lavorare su campioni paraffinati, offrendo due grandi vantaggi: la possibilità di abbattere il grosso problema dalla scarsa cellularità dovuto principalmente alla natura del tessuto, di tipo fibroso grazie alla macrodissezione per selezionare l'area tumorale di interesse; la possibilità di studiare casistiche ampie, poiché è possibile utilizzare materiale biologico archiviato (campioni paraffinati). I dati generati sono stati analizzati con il programma Nexus che si basa su un algoritmo che permette di

distinguere le cellule tumorali dalle cellule sane e fare l'analisi di copy number solo sulla quota di cellule malate. L'analisi con Oncoscan ha permesso di dividere la casistica in 2 categorie:

- 7 IPMN presentavano un cariotipo quasi normale, con nessuna o una alterazione focale;
- 13 IPMN avevano un cariotipo complesso, con più di 4 alterazioni ciascuno. Il numero medio di alterazioni nei casi complessi è stato 10 per ogni paziente. Dall'analisi è emerso che il numero di alterazioni è legato al grado di displasia suggerendo la presenza di differenze genetiche anche all'interno dei sottogruppi dell'IPMN a seconda del grado. È stata inoltre effettuata l'analisi mutazionale, mediante sequenziamento Sanger, dei geni KRAS, GNAS e TP53. Nella nostra casistica 6 dei 13 pazienti con displasia severa presentavano mutazioni o delezioni di TP53, confermando che alterazioni di TP53 sono presenti solo nei casi ad alto grado di displasia. Mutazioni di GNAS erano presenti in 2/20 casi, mentre mutazioni di KRAS erano presenti in 4/20 casi. Tuttavia, non è stata osservata alcuna correlazione tra queste ultime mutazioni e il grado di displasia. L'attenzione si è poi focalizzata sull'analisi di copy number degli IPMN a cariotipo complesso. Tra le alterazioni identificate ricordiamo:

- il gain del cromosoma 12q in cui è localizzato il gene che codifica per MDM2, proteina che regola l'attività di p53. Questa alterazione è particolarmente interessante poiché è un dato che potrebbe andare ad implementare quello di TP53;
- il gain del cromosoma 8q24 che contiene il gene MYC;
- il gain del cromosoma 3q riscontrato nel 92% dei casi.

In particolare quasi tutti i casi (12/13) con displasia severa e cariotipo complesso hanno il gain del 3q. Questa regione è particolarmente interessante perché include oncogeni come PIK3CA, GATA2 e TERC tutti legati alla deregolazione della crescita cellulare e alla progressione della malattia.

Il gain del cromosoma 3q è stato confermato sia mediante analisi FISH che Real time PCR. L'analisi FISH conferma la presenza di un aumento del numero di copie del cromosoma 3 in pazienti con IPMN con cariotipo complesso, sostenendo i dati ottenuti con gli array. Anche l'analisi di copy number mediante Real time PCR, eseguita utilizzando primers localizzati sul 3p, ha confermato l'amplificazione del cromosoma 3 in IPMN con cariotipo complesso rispetto a IPMN con cariotipo normale con un p-value di 0,008. Concentrandosi in maniera specifica sul gene PIK3CA, l'analisi di copy number mediante Real time PCR ha confermato l'aumento del numero di copie di questa regione genomica in IPMN con cariotipo complesso.

Inoltre è stata eseguita l'analisi di gene expression mediante Real time PCR dei geni PIK3CA e TERC. L'espressione di mRNA di PIK3CA e TERC è up-regolata in IPMN con gain di 3q rispetto a IPMN con cariotipo normale, quindi questi sembrerebbero essere tra i più importanti geni bersaglio del gain 3q. Questi dati sul gain e sulla over-espressione dei geni PIK3CA e TERC suggerisce che

essi possano essere valutati come biomarcatori utili fin dai primi stadi per identificare pazienti con IPMN ad alto rischio.

Con l'avvento della nuova tecnologie di sequenziamento, in particolare il sequenziamento massivo dell'RNA (RNA-seq) e il sequenziamento dell'intero esoma (Whole Exome Sequencing, WES) è possibile identificare in modo accurato e dettagliato un grande numero di mutazioni ricorrenti. La caratterizzazione genomica del PDAC tramite l'analisi molecolare di tutte le alterazioni somatiche ha generato molte informazioni, evidenziando un panorama mutazionale molto complesso. La maggior parte delle mutazioni nel tumore del pancreas può essere raggruppato in vie di segnale comuni. Jones et al hanno identificato un set di 69 geni mutati nella maggior parte dei 24 campioni da loro analizzati, di cui 31 potrebbero essere raggruppati in 12 vie di segnalazione principali, tra cui: KRAS; – transforming growth factor (TGF)- β ; controllo del danno al DNA; apoptosi; regolazione delle fasi G1/S del ciclo cellulare; la via di segnalazione di Hedgehog; la via di segnalazione Wnt/Notch; la via di regolazione dei processi di invasione cellulare.

Tuttavia, nonostante la migliore e più approfondita conoscenza delle alterazioni molecolari del PDAC, attualmente tali informazioni non sono state traslate nella pratica clinica e non hanno permesso di incrementare l'attuale classificazione prognostica del PDAC a causa dell'alta eterogeneità molecolare e dell'alta instabilità genetica che ostacola l'identificazione di biomarcatori prognostici o predittivi.

Un' altro obiettivo è stato quello di capire meglio la biologia del PDAC, al fine sia di migliorare la classificazione prognostica di questo tumore, sia di identificare nuove strategie terapeutiche. A tale scopo, sono stati analizzati 30 campioni di PDAC, mediante tecnica RNA-seq (9 campioni) e WES (21 campioni). In questo studio sono stati identificati 43 geni alterati ricorrenti, che sono coinvolti in numerose vie di segnale

I dati attuali hanno confermato la presenza di mutazioni cardine già identificate in letteratura come KRAS, TP53, CDKN2A e SMAD4, con frequenze rispettivamente del 100%, 60%, 16% e 10%. Altri geni mutati con elevata frequenza identificati in questo studio sono stati: MUC4, GNAS, SMAD4, TGFBR2, FLG, OR10Z1, SMARCA2, DNAH14, TTN, BAI1, RALGAPB, RNF43, PBRM1, OBSCN, PRRC2C, CCDC168, AIM1L, E4F1 e POM121L12. L'analisi delle vie di segnale ha inoltre dimostrato che i geni con una maggiore frequenza di aberrazioni clusterizzavano in specifiche vie di segnale: KRAS signalling, TGF- β signalling, rimodellamento della cromatina, Wnt signalling, riparazione del danno al DNA, ciclo cellulare; processamento del RNA. Come atteso, poiché KRAS è un oncogene chiave per l'insorgenza del tumore al pancreas, le mutazioni di KRAS erano le più frequenti e localizzavano in specifici hotspot (G12D, G12V, G12R e G12C).

Per comprendere quali potessero essere le mutazioni driving del PDAC, sono state condotte analisi di correlazione dei dati mutazionali e clinici solo nei pazienti in fase precoce di malattia (pazienti con PDAC primari, operabili e non trattati). I dati di letteratura riportano una sopravvivenza globale (OS) a 5 anni del 25% nei pazienti PDAC sottoposti a resezione chirurgica; tuttavia la maggior parte di questi sviluppa una recidiva dopo la resezione. Utilizzando il valore di 25 mesi di OS come cut-off, tali pazienti sono stati suddivisi nei sottogruppi con migliore (>25 mesi) o peggiore (< 25 mesi) OS. Valutando il carico mutazionale il presente studio ha dimostrato che i campioni del sottogruppo a migliore OS possiedono meno alterazioni genomiche rispetto ai campioni del sottogruppo a peggiore OS (valori medi rispettivamente di 24 e 40 mutazioni). Questo risultato evidenzia l'importanza e l'urgenza di individuare le caratteristiche molecolari che caratterizzano questi tumori e possano preventivamente indirizzare la classificazione clinico-patologica. Si può ipotizzare che i tumori con mutazioni molecolari elevate hanno un fenotipo più aggressivo; quindi, l'identificazione di questi pazienti durante la fase diagnostica iniziale potrebbe indirizzarli verso un trattamento neoadiuvante prima della chirurgia.

Nel presente studio, è stata identificata in campioni ottenuti da pazienti sottoposti a resezione chirurgica un'elevata prevalenza di mutazioni (33%) nel gene MUC4 suggerendo così la sua importanza nella carcinogenesi del PDAC. MUC4 è il gene che codifica per la mucina di tipo I legata alla membrana che promuove proliferazione, motilità, invasività, transizione epitelio-mesenchimale, chemoresistenza e crescita del tumore. Inoltre, la sua over-espressione è correlata con la carcinogenesi nel pancreas e viene identificata nella fase preneoplastica. Urey et al hanno studiato l'espressione di MUC4 mediante immunoistochimica e hanno riportato che una bassa espressione di MUC4 è associata ad una maggiore sopravvivenza in pazienti con tumore al pancreas chirurgicamente resecabili in trattamento adiuvante con gemcitabina. Tuttavia, nel presente studio non sono state rilevate differenze nelle mutazioni di MUC4 tra i campioni appartenenti ai sottogruppi lunga sopravvivenza rispetto a breve sopravvivenza.

La delezione di RNF43 è stata rilevata solo in due casi con PDAC associato a neoplasia mucillare papillare intraductal (IPMN) nel gruppo a lunga sopravvivenza. Mutazioni inattivanti il gene RNF43, che codifica per una proteina con attività intrinseca U3 ubiquitina ligasi, sono stati riportati in IPMN del pancreas. Secondo uno studio precedente, IPMN ha una prognosi migliore rispetto al PDAC convenzionale, e l'identificazione nel presente studio di delezioni di RNF43 solo nel gruppo a lunga sopravvivenza supporterebbe tale ipotesi. Infatti l'inattivazione mutazionale di RNF43 sembra conferire dipendenza da Wnt, quindi la presenza di mutazioni RNF43 potrebbe essere usata come biomarcatore predittivo per l'uso di inibitori di Wnt.

In conclusione, il presente studio ha confermato la presenza di un complesso panorama genetico nel PDAC e ha suggerito la correlazione tra un genoma più complesso, un fenotipo più aggressivo e una prognosi sfavorevole. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per identificare i biomarcatori molecolari che caratterizzano il cancro del pancreas, in particolare nella fase iniziale.

7. BIBLIOGRAFIA

1. *Cancer statistics, 2013*. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** s.l. : CA Cancer J Clin, 2013, Vol. 63(1):11-30.
2. *Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators*. **Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL.** 4(6):567-79, s.l. : J Gastrointest Surg, 2000.
3. *Epidemiology and risk factor in pancreatic cancer*. **Olson SH, Kurtz RC.** s.l. : J Surg Oncol, 2012. 10.1002/jso.23149.
4. *Pancreatic cancer*. **M, Hidalgo.** s.l. : N Engl J Med, 2010. 362(17):1605-17.
5. *Is pancreatic cancer a preventable disease?* **Gapstur SM, Gann P.** s.l. : JAMA, 2001. 286(8):967-8.
6. *Review of screening for pancreatic cancer in high risk individuals*. **Stoita A, Penman ID, Williams DB.** s.l. : World J Gastroenterol, 2011. 17(19):2365-71.
7. *Advances in Counselling and Surveillance of Patients at Risk for Pancreatic Cancer*. **Randall E Brand, Markus M Lerch, Wendy S Rubinstein, et al:** Gut 2007;56:1460–1469.
8. *Risk assessment, screening programs and clinical approach: a position paper from the Italian Registry*. **Del Chiaro M, Zerbi A, Capurso G, et al.** **Familial pancreatic cancer in Italy** Dig Liver Dis 2010; 42(9): 597-605.
9. *Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia*. **van Heek NT, Meeker AK, Kern SE.** s.l. : Am J Pathol, 2002. 161(5):1541-7.
10. *Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors*. **Gisselsson D, Jonson T, Petersén A.** s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(22):12683-8.
11. *Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer*. **Yachida S, Jones S et al.:** Nature 2010Oct28;467(7319):1114-7. doi: 10.1038/nature09515
12. *Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses*. **Jones S, Zhang X, Parsons DW.** s.l. : Science, 2008. 321(5897):1801-6
13. *Ductal adenocarcinoma of the pancreas:WHO classification of tumours of the digestive system*. **Hruban R, Boffetta P, Hiraoka N, et al.** Lyon, IARC, 2010, pp 279-291.
14. *Micro-RNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma*. **Szafranska AE, Davison TS, John J , et al.** Oncogene. 2007;26:4442-4452
15. *Ductal adenocarcinoma variants and mixed neoplasms of the pancreas: WHO classification of tumours of the digestive system*. **Fukushima N, Hruban R, Kato Y, et al.** Lyon, IARC, 2010.

16. *Precursors to invasive pancreatic cancer.* **Maitra A, Fukushima N, Takaori K.** s.l. : Adv Anat Pathol, 2005. 12(2):81-91.
17. *Update on pancreatic intraepithelial neoplasia.* **Hruban RH, Maitra A, Goggins M.** s.l. : Int J Clin Exp Pathol, 2008. 1(4):306-16.
18. *An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms.* **Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS.** s.l. : Am J Surg Pathol, 2004. 28(8):977-87.
19. *Molecular Characteristics of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.* **Ottenhof NA, de Wilde RF, Maitra A.** s.l. : Patholog Res Int, 2011. 620601
20. *International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas.* **Tanaka M, Fernández-Del Castillo C, Adsay V.** s.l. : Pancreatology, 2012. 12(3):183-97.
21. *MUC2 expression and prevalence of high –grade dysplasia and invasive carcinoma in mixed-type intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas.* **Masuda A, Arisaka Y, Hara S, Matsumoto I, Takenaka M, Sakai A, Shioni H, Matsuki N, Sugimoto M et al:** Pancreatology. 2013 Nov-Dec;13(6):583-8.doi:10.1016/j.pa.203.08.007.Epub 2013 Aug 30
22. *High throughput mutation profiling in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN).* **Lubezky N, Ben-Haim M, Marmor S, et al.** J Gastrointest –surg. 2011;15:503-511.
23. *Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development.* **Wu J, Matthaei H, Maitra A, et al:** Science Transl Med. 2011;3:92ra66.
24. *Whole exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways.* **Wu J, Jao Y, Dal Molin M, et al:** Proc Natl Acad Sci Usa. 2011; 108:21188-21193.
25. *miRNA biomarkers in cyst fluid augment the diagnosis and management of pancreatic cyst.* **Matthaei H, Wylie D, Lloyd MB, et al:** Clin Cancer Res. 2012;18:4713-4724.
26. *Distinct progression pathway involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas.* **Furukawa et al:** Mod Pathol. 2005 Aug;18(8):1034-42
27. *Management of mucinous cystic neoplasms of the pancreas.* **Testini M, Gurrado A, Lissidini G.** s.l. : World J Gastroenterol, 2010. 16(45):5682-92.
28. *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.* **Moore MJ, Goldstein D, Hamm J.** s.l. : J Clin Oncol, 2007. 25(15):1960-6.

29. Nikiforova MN, Khalid A, Fasanella KE, et al. Integration of KRAS testing in the diagnosis of pancreatic cystic lesions: a clinical experience of 618 pancreatic cysts. *Mod Pathol* 2013;26:1478–87.
30. Wu J, Matthaei H, Maitra A, et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med* 2011;3:92ra66.
31. Tan MC, Basturk O, Brannon AR, et al. GNAS and KRAS mutations define separate progression pathways in intraductal papillary mucinous neoplasm associated carcinoma. *J Am Coll Surg* 2015;220: 845–54.e1.
32. Kanda M, Sadakari Y, Borges M, et al. Mutant TP53 in duodenal samples of pancreatic juice from patients with pancreatic cancer or high-grade dysplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:719–30.e5.
33. Garcia-Carracedo D, Chen ZM, Qiu W, et al. PIK3CA mutations in mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreas* 2014;43:245–9.
34. Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, et al. Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Oncol Rep* 2003;10:21–5.
35. Biankin AV, Biankin SA, Kench JG, et al. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002;50:861–8.
36. *Prognostic factors in periampullary and pancreatic tumor resection in elderly patients.* **Casadei R, Zanini N, Morselli-Labate AM.** s.l. : World J Surg, 2006. 30(11):1992-2001.
37. *Pancreatic adenocarcinoma: Outstanding problems.* **Zakharova OP, Karmazanovsky GG, Egorov VI.** s.l. : World J Gastrointest Surg, 2012. 27;4(5):104-13.
38. *Surgical treatment of resectable and borderline resectable pancreas cancer: expert consensus treatment.* **Evans DB, Farnell MB, Lillemoe KD, et al:** *Ann Surg Oncol* 16:1736-44, 2009.
39. *Arterial resection during pancreatotomy for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis.* **Mollberg N, Rahbari NN, Koch M, et al:** *Ann Surg* 254:882-93, 2011
40. *Systematic review of outcome of synchronous portal –superior mesenteric vein resection during pancreatotomy for cancer.* **Siriwardana HP, Siriwardena AK:** *Br J Surg* 93:662-73, 2006
41. *Surgery insight: surgical management of pancreatic cancer.* **Michalski CW, Weitz J, Büchler MW.** s.l. : *Nat Clin Pract Oncol*, 2007. 4(9):526-35.
42. *Laparoscopic staging of biliopancreatic malignancy.* **Gouma DJ, Nieveen van Dijkum EJ, de Wit LT.** s.l. : *Ann Oncol*, 1999. 10 Suppl 4:33-6.

43. *Pancreatic cancer surgery: the state of the art.* **Kim SC, Kim YH, Park KM.** s.l. : Curr Drug Targets, 2012. 13(6):764-71.
44. *S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007.* **Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC.** s.l. : Z Gastroenterol, 2007. 45(6):487-523.
45. *The role of radiotherapy in multimodal treatment of pancreatic carcinoma.* **Brunner TB, Scott-Brown M.** s.l. : Radiat Oncol, 2010. 5:64.
46. *Studies of intraoperative radiotherapy in carcinoma of the pancreas.* **Sindelar WF, Kinsella TJ.** s.l. : Ann Oncol, 1999. 10 Suppl 4:226-30.
47. *Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer.* **Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P:** J Clin Oncol 2007 Jun 20;25(18):2607-15.
48. *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.* **Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J.** s.l. : J Clin Oncol, 1997. 15(6):2403-13.
49. *Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas.* **Casper ES, Green MR, Kelsen DP.** s.l. : Invest New Drugs, 1994. 12(1):29-34
50. *Human equilibrative nucleoside transporter 1 predicts survival in patients with pancreatic cancer treated with gemcitabine: a meta-analysis.* **Zhu Y, Qi M, Lao L, Wang W, Hua L, Bai G:** Genet Test Mol Biomarkers, 2014 May;18(5):306-12. doi:10.1089/gtmb.2013.0419. Epub 2014 Mar 13.
51. *Fluorouracil: biochemistry and pharmacology.* **Pinedo HM, Peters GF.** s.l. : J Clin Oncol, 1988. 6(10):1653-64.
52. *Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity.* **Milano G, Etienne MC, Pierrefite V et al :** British Journal of Cancer 79, 627-630 (1999)
53. *Safety of capecitabine: a review.* **Mikhail SE, Sun JF, Marshall JL.** s.l. : Expert Opin Drug Saf, 2010. 9(5):831-41.
54. *Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design.* **C, Monneret.** s.l. : Ann Pharm Fr, 2011. 69(6):286-95.
55. *Oxaliplatin: a review of approved uses.* **Stein A, Arnold D.** s.l. : Expert Opin Pharmacother, 2012. 13(1):125-37
56. *Irinotecan pharmacogenomics.* **Marsch S, Hoskins JM:** Pharmacogenomics. 2010 Jul;11(7):1003-10. doi:10.2217/pgs.10.95

57. *SPARC /osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions.* **Sato N, Fukushima N, Mahera N, Matsubayashi H Koopmann J, Su G et al.**: Oncogene 2003;22:5021-5030.
58. *Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor based paclitaxel.* **Desai N, Tieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A et al.** Clin Cancer Res 2006;12:1317-1324.
59. *Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness.* **Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS.** s.l. : Anticancer Res, 1993. 13(3):565-9.
60. *Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial.* **Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A.** s.l. : J Clin Oncol, 2004. 22(13):2610-6.
61. *Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205.* **Philip PA, Benedetti J, Corless CL.** s.l. : J Clin Oncol, 2010. 28(22):3605-10.
62. *Gemcitabine combined with gefitinib in patients with inoperable or metastatic pancreatic cancer: a phase II Study of the Hellenic Cooperative Oncology Group with biomarker evaluation.* **Fountzilas G, Bobos M, Kalogera-Fountzila A.** s.l. : Cancer Invest, 2008. 26(8):784-93.
63. *Lapatinib/gemcitabine and Lapatinib/gemcitabine/oxaliplatin: a phase I study for advanced pancreaticobiliary cancer.* **Safran H, Miner T, Resnick M.** s.l. : Am J Clin Oncol, 2008. 31(2):140-4.
64. *Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu.* **Safran H, Iannitti D, Ramanathan R.** s.l. : Cancer Invest, 2004. 22(5):706-12.
65. *Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer.* **Kindler HL, Friberg G, Singh DA.** s.l. : J Clin Oncol, 2005. 23(31):8033-40.
66. *Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303).* **Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D.** s.l. : J Clin Oncol, 2010. 28(22):3617-22.
67. *Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium.* **Kindler HL, Wroblewski K, Wallace JA.** s.l. : Invest New Drugs, 2007. 30(1):382-6.

68. *A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer.* **Kindler HL, Richards DA, Garbo LE.** s.l. : Ann Oncol, 2012.
69. *Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis.* **Chambers AF, Matrisian LM:** J Natl Cancer Inst 89: 1260-1270, 1997
70. *A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer* **Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M and Buckels JA:** Br J Cancer 87: 161-167, 2002.
71. *Marimastat Pancreatic Cancer Study: Marimastat pancreatic cancer study group: marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial.* . **Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Buckels JA** J Clin Oncol 19: 3447-3455, 2001.
72. *Molecular targeted therapies for pancreatic cancer.* **Borja-Cacho D, Jensen EH, Saluja AK, Buchsbaum DJ and Vickers SM:** Am J Surg 196: 430-441, 2008
73. *Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer.* **Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, et al:** J Clin Oncol 22:1430-1438, 2004.
74. *Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer.* **Van Cutsem E, Vervenne WL et al:** J Clin Oncol, 2009 May 1;27(13) :2231-7. doi/JCO.2008.20.0238. Epub 2009 Mar 23.
75. *DNA microarrays in clinical cancer research.* **Wadlow R, Ramaswamy S.** s.l. : Curr Mol Med, 2005. 5(1):111-20.
76. *Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy.* **Petricoin EF 3rd, Bichsel VE, Calvert VS.** s.l. : J Clin Oncol, 2005. 23(15):3614-21.
77. *DNA microarray analysis of pancreatic malignancies.* **Brandt R, Grützmann R, Bauer A.** s.l. : Pancreatology, 2004. 4(6):587-97.
78. *Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives.* **Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A.** s.l. : Cancer Treat Rev, 2009. 35(3):201-9.
79. *Genome-wide approaches for cancer gene discovery.* **Lizardi PM, Forloni M, Wajapeyee N.** s.l. : Trends Biotechnol, 2011. 29(11):558-68.
80. *Array-based approaches to cancer genome analysis.* **Garraway L, Sellers W.** s.l. : Elsevier Drug Discovery Today: Disease Mechanism, 2005, Vol. 2.
81. <http://www.affymetrix.com/estore/>.

82. *Systems biology and genomics of breast cancer*. **Perou CM, Børresen-Dale AL**. s.l. : Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(2). pii: a003293.
83. *Identification of structural aberrations in cancer by SNP array analysis*. **Heinrichs S, Look AT**. s.l. : Genome Biol, 2007. 8(7):219.
84. *Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia*. **Mullighan CG, Goorha S, Radtke I**. s.l. : Nature, 2007. 446(7137):758-64.
85. *Integrative genomic analyses identify MTF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma*. **Garraway LA, Widlund HR, Sellers WR**. s.l. : Nature, 2005. 436(7047):117-22.
86. *Next generation sequencing technologies*. **Thomas Jarvie**. [Drug Discov Today Technol](#). 2005 Autumn;2(3):255-60. doi: 10.1016/j.ddtec.2005.08.003.
87. *Dna sequencing with chain terminating inhibitors*. **Sanger F et al**: Proc.-natl.Acad.Sci.U.S.A.74(12):5463-7.
88. *Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing*. **Matthew Meyerson et al**: Nat Rev Genet.2010 Oct;11(10):685-96.doi:10.1038/nrg2841.
89. *Dna sequencing of a cytogenically normal acute myeloid leukaemia genome*. **Ley T.J. et al**: Nature 456, 66-72(2008)
90. *Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing*. **Campbell PJ et al**. Nat Genet. Jun 2008;40(6):722-729
91. *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. **Tomlins SA, et al**. Science 310,644-648(2005)
92. *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. **Soda M et al**: Nature 448,561-566(2007)
93. *Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene*. **Jones S, et al**: Science.2009 Apr 10;324(5924):217.doi:10.1126/science.1171202.Epub 2009 Mar 5.
94. *Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer*. **Maher CA et al**. Nature 458, 97-101(2009).
95. *Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary*. **Shah SP et al**. N.Engl. J. Med 360,2719-2729(2009)
96. http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/genome_analyzer_iix.html
97. *Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges*. **Xuan J et al**: Cancer letters 340(2013) 284-295.